Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung der Blütenpflanze Matthiola Incana (Brassicaceae)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

Ingrid Gollmer
aus Dettingen/Erms

1980

Untersuchungen zur Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung der Blütenpflanze Matthiola Incana (Brassicaceae)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

Ingrid Gollmer
aus Dettingen/Erms

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 1980

Dekan: Professor Dr. W. Seyffert
1. Berichterstatter: Professor Dr. Vera Hemleben
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

Frau Prof. Dr. Vera Hemleben danke ich herzlich für ihre intensive wissenschaftliche Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.
Den Mitarbeitern des Labors danke ich für die gemeinsame Erarbeitung von Methoden; besonders Fräulein Anne Roth für die Durchführung der Gradientenhybridisierung in Kapitel 3.4.1.
Die Versuche zur In-vitro-Proteinsynthese wurden teilweise im Weizmann-Institut, Rehovot, Israel, unter Anleitung von Dr. J. Gressel und Dr. A. Reisfeld durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Anzucht der Versuchsobjekte	6
2.1.1	Anzucht der Keimlinge von M.incana	6
2.1.2	Anzucht der Blütenpflanzen von M.incana	6
2.2	Radioaktive Markierung der Keimlinge mit ^{3}H-Uridin oder mit ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenin	6
2.3	Aufarbeitung der Versuchsobjekte	7
2.3.1	Isolierung der DNS aus Keimlingen	7
2.3.2	Isolierung der RNS aus Keimlingen und Blütenblättern	8
2.3.3	Isolierung der RNS aus isolierten Zellkernen von Keimlingen	9
2.4	Charakterisierung der Nukleinsäuren	10
2.4.1	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNS und RNS	10
2.4.2	Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	10
2.5	Isolierung der Poly(A)-RNA durch die Affinitäts-chromatographie auf Poly(U)-Sepharose oder Oligo(dT)-Cellulose	11
2.6	Molekulargewichtsbestimmung der RNS	12
2.6.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
2.6.2	Formamid-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
2.7	Radioaktive Markierung der Poly(A)-RNS und Poly(A)$^{-}$-RNS mit ^{125}Jod	14
2.8	Sättigungshybridisierung von Gesamt-DNS und Poly(A)-RNS mit der Filtertechnik	15
2.8.1	Fixierung der DNS auf Nitrocelluloseﬁltern	15
2.8.2	Sättigungshybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS	16
2.8.3	DNS-Bestimmung auf den Filtern	16
2.8.4	Anpassung an Sättigungskurven	16

		Seite
2.9	Hybridisierung von Restriktionsfragmenten der DNS mit Poly(A)$^-$-RNS und Poly(A)-RNS	17
2.9.1	Abbau der DNS mit Restriktionsenzymen	17
2.9.2	Agarose-Gelelektrophorese der abgebauten DNS	18
2.9.3	Elution der DNS-Fragmente und Hybridisierung mit ^{125}Jod-Poly(A)$^-$-RNS und ^{125}Jod-Poly(A)-RNS	19
2.10	Isolierung von Proteinen aus Blütenblättern durch die Fällung mit Ammoniumsulfat	20
2.11	In-vitro-Proteinsynthese	21
2.11.1	In-vitro-Proteinsynthese im Weizenkeim-System	21
2.11.1.1	Präparation des zellfreien Proteinsynthese-Systems aus Weizenkeimen	21
2.11.1.2	In-vitro-Proteinsynthese im Weizenkeim-System	22
2.11.1.3	In-vitro-Proteinsynthese im Reticulocyten-Lysat	22
2.11.1.4	Elektrophorese der Translationsprodukte in SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen	23
2.11.1.5	Färben der Gele und Fluorographie	23
2.12	Chemikalien	24
2.13	Abkürzungen	26

3. ERGEBNISSE

3.1	Isolierung der Poly(A)-RNS	28
3.2	Bestimmung des Molekulargewichts der RNS	30
3.2.1	Molekulargewicht der Poly(A)$^-$-RNS	30
3.2.2	Molekulargewicht der Poly(A)-RNS	33
3.3	Transkriptionsraten von Gesamt-RNS und Poly(A)-RNS	35
3.4	Sättigungshybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS	37
3.4.1	Sättigungshybridisierung von einzelnen DNS-Fraktionen eines Actinomycin-Cäsiumchlorid-Gradienten und Poly(A)-RNS	39
3.4.2	Sättigungshybridisierung von vorhybridisierter DNS und Poly(A)-RNS	41

Seite

3.4.3	Sättigungshybridisierung von vorhybridisierter DNS und nuklearer Poly(A)-RNS	43
3.4.4	Sättigungshybridisierung von vorhybridisierter DNS und Poly(A)-RNS aus Blüten von M.incana	47
3.4.5	Genzahl-Schätzungen	50
3.5	Hybridisierung von Restriktionsfragmenten der DNS und Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^-$-RNS	53
3.5.1	Hybridisierung von Bst I-Restriktionsfragmenten und Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^-$-RNS	55
3.5.2	Hybridisierung von Eco R I-Restriktionsfragmenten und Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^-$-RNS	58
3.6	In-vitro-Translation der Poly(A)-RNS in zellfreien Proteinsynthese-Systemen	62
3.6.1	Genetik der Anthocyan-Biosynthese	62
3.6.2	In-vivo-Proteinmuster in Blüten von M.incana	67
3.6.3	In-vitro-Proteinsynthese im zellfreien Weizenkeim-S30-System	69
3.6.4	In-vitro-Proteinsynthese im zellfreien Kaninchen-Reticulocyten-Lysat	72

4. DISKUSSION 76

5. ZUSAMMENFASSUNG 91

6. LITERATURVERZEICHNIS 94

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0016

1. EINLEITUNG

Das Genom vieler Eukaryonten ist von einer hohen Komplexität und kann, im Gegensatz zu Prokaryonten, in mehrere spezifische Fraktionen gegliedert werden, die sich aufgrund ihres Repetitionsgrads im Genom und in ihrem renaturierungskinetischen Verhalten unterscheiden. Die hohe Komplexität und die Organisation der DNS-Sequenzen sind nach bereits vorliegenden Ergebnissen in tierischen und pflanzlichen Objekten offenbar identisch (Davidson und Britten, 1973; Davidson et al., 1977; Walbot und Dure, 1976; Zimmerman und Goldberg, 1976; Wenzel, 1977; Kiper und Herzfeld, 1978). Hoch-repetitive, kurze DNS-Sequenzen, die als Satelliten-DNS z.B. im Cäsiumchlorid-Gradienten auftreten können, kommen lokal gehäuft an verschiedenen Bereichen der Chromosomen vor. Die mittel-repetitiven DNS-Sequenzen enthalten die unterschiedlich stark redundanten Sequenzen der ribosomalen RNS- und Transfer-RNS-Gene, die Histongene und möglicherweise auch redundante Strukturgene (Darnell, 1979; Naora, 1979). Zu dieser Gruppe gehören auch solche DNS-Sequenzen, die verstreut im Genom zwischen Unique-DNS-Sequenzen liegen und für ein definiertes Interspersionsmuster verantwortlich sind. Bei höheren Pflanzen ist dabei von besonderem Interesse, daß ihr Genom im Vergleich zu tierischen Eukaryonten einen höheren Anteil an repetitiven DNS-Sequenzen besitzt, der durchschnittlich mehr als 60 % beträgt (Flavell et al., 1974). Obwohl direkte Beweise noch nicht vorliegen, wird den repetitiven DNS-Sequenzen eine vorwiegend regulatorische Funktion zugeschrieben (Davidson und Britten, 1979).

Die Gruppe der eigentlichen Strukturgene ist in der Unique-DNS oder Single-copy-DNS-Fraktion lokalisiert. Aus Hybridisierungsdaten läßt sich ableiten, daß nur ein geringer Teil der Unique-DNS tatsächlich informative Sequenzen enthält, d.h. für Proteine codiert. Dieses Phänomen des "Gen-Exzesses" in der Unique-DNS ist noch ungeklärt (Wenzel und Hemleben, 1979).

Bei Pflanzen errechnet sich aus dem DNS-Gehalt pro haploidem Genom, der von weniger als 1 pg bis zu mehr als 100 pg variieren kann (Rees und Jones, 1972), eine theoretische Informationskapazität des Genoms für mehr als 10^6 verschiedene Proteine. Genetische Überlegungen führten aber zu der Annahme, daß nur ein Maximum von etwa 50.000 Strukturgenen während des gesamten Lebenszyklus eines Organismus exprimiert werden (Ohta und Kimura, 1971). Dieser DNS-Überschuß impliziert die Existenz komplexer Regulationsmechanismen zur Steuerung der Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung eines Organismus.

Basierend auf diesen Überlegungen ist es im Hinblick auf eine differentielle Genexpression bei höheren Pflanzen von Interesse zu untersuchen, in welchem Ausmaß die Unique-DNS-Sequenzen transkribiert werden, und welche Anzahl von aktiven Strukturgenen erforderlich ist, um die Zellfunktionen in einem definierten Zelltyp oder Gewebe aufrecht zu erhalten.
Als Objekt für diese Untersuchungen wird die Blütenpflanze Matthiola incana (Brassicaceae) verwendet. Das Genom von M.incana besteht aus vier Komponenten: Einer hoch-repetitiven oder palindromischen DNS-Fraktion, zwei Komponenten der mittelrepetitiven DNS-Fraktion ("slow"- und "fast"-repetitiv) und der Unique-DNS-Fraktion. Der Anteil der repetitiven Sequenzen beträgt bei M.incana annähernd 70 %, während die Unique-DNS-Fraktion etwa 30 % des Gesamtgenoms darstellt (Wenzel, 1977; Wenzel und Hemleben, 1979). Im Gegensatz zur Genomorganisation ist über die Genexpression bei M.incana, abgesehen von der Transkription der ribosomalen RNS (Grierson und Hemleben, 1977; Friedrich et al., 1979) nocht nichts bekannt.

In dieser Arbeit soll nun versucht werden, nähere Informationen über eine differentielle Genexpression im Entwicklungsstadium der Keimlinge und in dem differenzierten Gewebe der Blüten von M.incana zu gewinnen. Zur Untersuchung dieser Fragen wird zunächst die Poly(A)-RNS als ein Primärprodukt der Genexpression

hinsichtlich ihrer Größenverteilung und des Molekulargewichts näher charakterisiert. Die Frage nach dem Prozentsatz der Unique-DNS-Sequenzen, die einer aktiven Transkription unterliegen, bzw. die Frage nach der Anzahl der in Keimlingen bzw. Blüten aktiv transkribierten Gene wird mit Hilfe der Sättigungshybridisierung mit der Filtertechnik von DNS und der jeweiligen Poly(A)-RNS-Population untersucht.

In allen tierischen Zellen, die bisher untersucht wurden, ist die Sequenzkomplexität der hnRNS um einen Faktor von 4 bis mehr als 10 höher als die der cytoplasmatischen oder polysomalen mRNS (Getz et al., 1975; Hough et al., 1975; Liarakos et al., 1975; Ryffel, 1976; Bantle und Hahn, 1976; Levy et al., 1976; Kleiman et al., 1977). Die Funktion der hnRNS ist noch weitgehend unbekannt, wird aber sowohl mit der mRNS-Synthese in Bezug auf eine Precursor-Produkt-Beziehung als auch mit der Genregulation in Zusammenhang gebracht (Darnell et al., 1974; Herman et al., 1976; Davidson et al., 1977).
Bei höheren Pflanzen ist die Existenz einer hnRNS, die möglicherweise die Funktion eines Precursors der cytoplasmatischen mRNS hat, noch nicht eindeutig nachgewiesen. Lediglich Goldberg et al. (1978) fanden kürzlich eine nukleare RNS in Tabakblättern, deren Sequenzkomplexität mit derjenigen der hnRNS tierischer Zellen vergleichbar ist und die etwa 4-mal höher ist als diejenige der polysomalen mRNS.
Die Frage, ob in Keimlingen von M.incana eine ähnliche Klasse von nuklearer RNS vorliegt und um welchen Faktor ihre Größe verschieden von cytoplasmatischer Poly(A)-RNS ist, wird mit Hilfe der Sättigungshybridisierung mit der Filtertechnik von DNS und nuklearer Poly(A)-RNS aus Keimlingen überprüft.

In differenzierten Zellen oder Geweben wird die Identifizierung einer spezifischen mRNS oftmals dadurch erleichtert, daß ihr Proteinprodukt das in der Zelle am häufigsten auftretende Protein

darstellt. Typische Beispiele bei tierischen Eukaryonten sind die Globin-mRNS in Hühner- und Kaninchen-Erythrocyten (Bishop und Rosbash, 1973; Hunt, 1974 und 1976) oder die Ovalbumin-mRNS in Maus- und Hühner-Ovidukten (Sullivan et al., 1973; Harris et al., 1973 und 1975). Bei pflanzlichen Eukaryonten ist dies z.B. der Fall für die mRNS des Zein-Proteins im Mais-Endosperm (Wienand und Feix, 1978). Andere mRNS-Spezies können gezielt durch Hormon- oder Licht-Induktion aktiviert werden. So z.B. die Hormon-Induktion der mRNS für die α-Amylase im Aleuron der Gerste (Muthukrishnan et al., 1979), oder die Licht-Induktion der mRNS für die kleine Untereinheit der Ribulosediphosphat-Carboxylase in Lemna gibba (Tobin, 1978) und der mRNS für das Apoprotein des "light-harvesting" Chlorophyll-a/b-Proteins der Gerste (Apel und Kloppstech, 1978; Apel, 1979).

Die Möglichkeit zur Identifizierung spezifischer mRNS-Klassen ist bei M.incana jedoch durch die Tatsache gegeben, daß sich die einzelnen Stämme lediglich durch eine verschiedene, genetisch bedingte Anthocyan-Biosynthese unterscheiden, die sich phänotypisch in einer unterschiedlichen Qualität und Quantität des Antocyanmusters in den Blüten äußert (Seyffert, 1971). Dabei wird von der Erwartung ausgegangen, daß die Blüten von M.incana als differenziertes, Anthocyan-synthetisierendes Gewebe eine mRNS-Population enthalten, die aus definierteren mRNS-Klassen zusammengesetzt ist im Vergleich zum komplexeren Spektrum der mRNS-Population in Keimlingen von M.incana.
Von besonderem Interesse ist dabei die Frage, ob zwischen Keimlingen und Blüten Änderungen in der Zusammensetzung der mRNS-Populationen auftreten im Hinblick auf das Vorhandensein von abundanten mRNS-Klassen. Es ist bekannt, daß speziell die hoch abundanten Spezies der mRNS einer exzessiven Regulation unterliegen, und es wird vermutet, daß sie eine wichtige Rolle bei Differenzierungsprozessen spielen (Harris et al., 1975;, Daneholt, 1975; Galau et al., 1976; Hunt, 1976; Davidson und Britten, 1979).

Zur Untersuchung dieses Fragenkomplexes soll zunächst überprüft werden, ob sich die Zusammensetzung der mRNS-Populationen aus Keimlingen und Blüten von M.incana hinsichtlich abundanter mRNS-Klassen unterscheidet.
Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht in der Untersuchung der Möglichkeit, Stadien-spezifische mRNS-Klassen in Keimlingen bzw. Blüten eines M.incana-Stammes und Blüten-spezifische mRNS-Klassen auf dem Hintergrund der Unterschiede in der Anthocyan-Biosynthese in den Blüten verschiedener M.incana-Stämme zu identifizieren. Diese Fragen werden mit Hilfe der In-vitro-Translation der einzelnen mRNS-Populationen in zellfreien Proteinsynthese-Systemen untersucht. Darüberhinaus soll durch die Hybridisierung der Poly(A)-RNS-Populationen an Restriktionsfragmente der DNS versucht werden, die den spezifischen mRNS-Klassen komplementären DNS-Sequenzen, d.h. die zugehörigen Gensequenzen, zu identifizieren. Bei einem positiven Verlauf der Experimente sollte künftig die Möglichkeit bestehen, spezifische Gene für weitere Untersuchungen zur Regulation der Genexpression bei M.incana zu isolieren und anzureichern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Anzucht der Versuchsobjekte

2.1.1 Anzucht der Keimlinge von M.incana

Samen von M.incana, Stamm 17 (Samensammlung des Instituts für Biologie II, Universität Tübingen; Seyffert, 1971) wurden für 10 min mit einer Spatelspitze des Fungicids Orthocid (Fa. Merck) geschüttelt, in eine sterile Petrischale überführt und zur Entfernung des Orthocids mehrmals mit sterilem dest. H_2O gewaschen. Jeweils etwa 20 Samen wurden mit 400 µl sterilem dest. H_2O in sterile Kulturgläschen überführt. Die Samenkeimung erfolgte im Klimaschrank bei 18-20 ^{o}C unter Dauerlicht (3.000 Lux) oder Dauerdunkel.

2.1.2 Anzucht der Blütenpflanzen von M.incana

Samen von M.incana, Stämme 04, 06 und 17, wurden in Töpfen ausgesät und unter Gewächshausbedingungen bis zur Blütenbildung angezogen. Die Ernte der Blüten erfolgte im Stadium der Blütenknospen, in dem die Anthocyan-Synthese bereits begonnen hatte, in dem die Kelchblätter aber noch geschlossen waren (vgl. Abb. 8).

2.2 Radioaktive Markierung der Keimlinge mit ^{3}H-Uridin oder mit ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenin

Die Keimlinge von M.incana wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Keimung und für unterschiedlich lange Zeiten mit jeweils 100 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin (spez. Radioaktivität 27 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Zur Präparation der RNS aus isolierten Zellkernen wurden die Keimlinge mit jeweils 100 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin und (8'-^{3}H)-Adenin (spez. Radioakt. 22 Ci/mmol) für die angegebenen

Zeiten radioaktiv markiert. Ein von der genannten Konzentration der Radioaktivität abweichender Wert wird im jeweiligen Experiment gesondert angegeben.
Erfolgte die radioaktive Markierung nicht sofort mit dem Keimungsbeginn der Samen, wurde zum angegebenen Zeitpunkt nach Keimungsbeginn das restliche dest. H_2O aus den Kulturgläschen entfernt, durch die radioaktive Lösung ersetzt, und die Keimlinge für die entsprechenden Zeitabschnitte weiter inkubiert.

2.3 Aufarbeitung der Versuchsobjekte

2.3.1 Isolierung der DNS aus Keimlingen (nach Hemleben et al., 1975)

Zur Isolierung der DNS wurden 6 Tage alte Keimlinge bei 4^oC mit Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5 (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM Na_2EDTA) + 1 % SDS (Endkonzentration) zunächst in einer Reibschale mit Pistill und weiter in einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Das Homogenat wurde mit 1 Volumen Kirby-Mix (88 ml Phenol,wassergesättigt, 12 ml m-Kresol, o,1 g 8-Hydroxychinolin) für 15 min geschüttelt, für 10 min bei 5.000 Upm in der Christ-Minifuge bei 4^oC zentrifugiert und die wässrige Phase abgehoben. Die Phenolphase wurde mit 1/2 Volumen Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5 + 1 % SDS nachextrahiert.
Die vereinigten wässrigen Phasen wurden noch einmal mit 1/2 Volumen Kirby-Mix ausgeschüttelt, zentrifugiert, die wässrige Phase abgehoben, und die Phenolphase wieder reextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit 2 Volumen 96 % Äthanol bei -28^oC über Nacht ausgefällt.
Nach der Fällung wurde das Präzipitat abzentrifugiert, mit 70 % Äthanol gewaschen, unter steriler Luft getrocknet und in Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5 aufgenommen. Die Lösung wurde 1 Stunde bei 37^oC mit 50 µg/ml RNase A (Fa. Böhringer) inkubiert und die DNS anschließend durch Ausschütteln mit Kirby-Mix : Chloroform (1:1) und Nachextraktion der Phenolphase mit Tris-EDTA, pH 7,5 + 1 % SDS wie oben beschrieben isoliert und mit 96 % Äthanol gefällt.

Nach mehrmaliger Repräzipitation wurde die DNS zur weiteren Reinigung in einem neutralen Cäsiumchlorid-Gradienten zentrifugiert. Dazu wurden etwa 100 - 400 µg DNS in 56,2 % CsCl in Tris-EDTA, pH 7,5 (mittlere Dichte 1,7o g/ml) bei 32.500 Upm und 20°C für 60 Stunden im Ti 50 - Rotor (Beckman) zentrifugiert und die DNS-Fraktionen vereinigt.
In einigen Sättigungshybridisierungsexperimenten wurde eine DNS eingesetzt, von der zuvor die ribosomale DNS durch die Zentrifugation in einem Actinomycin-Cäsiumchlorid-Gradienten abgetrennt worden war (Hemleben et al., 1977). Dazu wurden 7,5 g CsCl in 7,5 ml 0,025 M Natriumborat-Puffer ($Na_2B_4O_7$), pH 9,2 (in diesem Volumen sind bereits etwa 400 µg DNS enthalten) gelöst. Diese DNS-CsCl-Lösung wurde auf 3°C abgekühlt und 0,25 ml Actinomycin D (Stammlösung 1 mg/ml) zugegeben. Der Brechungsindex beträgt bei 3°C 1,39, entsprechend einer mittleren Dichte von 1,598. Die Lösung wurde in Zentrifugenröhrchen eingefüllt und bei 3°C für 85 Stunden bei 30.000 Upm im Rotor Ti 50 (Beckman) zentrifugiert. Die Gradienten wurden anschließend mit einem ISCO-Fraktionator fraktioniert.

2.3.2 Isolierung der RNS aus Keimlingen und Blütenblättern (nach Grierson und Covey, 1975)

Die Keimlinge oder Blütenblätter (die Kelchblätter wurden zuvor entfernt) wurden bei 4°C mit TNS-Medium (1 % TNS, 6 % p-Aminosalicylsäure, 5 % wassergesättigtes Phenol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3) im Mörser vorhomogenisiert. Der weitere Zellaufschluß erfolgte im Glashomogenisator (Keimlinge) oder mit dem Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel; Blütenblätter). Ausschütteln und Reextraktion des Homogenats erfolgte mit Kirby-Mix : Chloroform (1:1) und TNS-Medium wie in Kapitel 2.3.1 für die DNS-Isolierung beschrieben.
Im Anschluß daran wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden die Nukleinsäuren in Tris-Mg-Puffer, pH 7,5 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM $MgCl_2$) gelöst und 30-60 min bei 37°C mit

20 µg/ml DNase I (Reinheitsgrad I; Fa. Böhringer) inkubiert, und die RNS mit Kirby-Mix : Chloroform (1:1) und Tris-Mg-Puffer, pH 7,5 + 1 % SDS isoliert und anschließend mit Äthanol ausgefällt. Im Anschluß daran erfolgte eine mehrfache Repräzipitation der RNS mit 0.5 M Natriumacetat, pH 6,0 + 0,5 % SDS.
In einigen Experimenten wurde die RNS anstelle der DNase-Behandlung durch die Zentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten nach der Methode von Glisin et al. (1974) gereinigt. Dazu wurde die RNS-Präparation in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 % Sarkosyl gelöst und 1 g Cäsiumchlorid pro ml Lösung zugegeben.Von dieser Lösung wurden 2,3 ml auf eine 1,2-ml-Schicht von 5,7 M CsCl, 100 mM EDTA, pH 7,5, in einem Polyallomer-Zentrifugenröhrchen vorsichtig aufgeschichtet. Die 5,7 M CsCl-Schicht diente dazu, die Sedimentation der DNS zu verhindern. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit Paraffin aufgefüllt und im Rotor Ti 50 (Beckman) bei 33.000 Upm für 18 Stunden bei 24^{o}C zentrifugiert. Anschließend wurden die flüssigen Schichten abgehoben und der Boden des Röhrchens mit dem RNS-Sediment abgeschnitten. Die RNS wurde vom Röhrchenboden entfernt, in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, suspendiert und für mehrere Stunden gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA dialysiert.

2.3.3 Isolierung der RNS aus isolierten Zellkernen von Keimlingen

Der Zellaufschluß zur Isolierung der Zellkerne erfolgte bei 4^{o}C in Kernisolierungsmedium (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 400 mM Saccharose, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl) mit dem Ultra-Turrax oder im Glashomogenisator (Leber, 1977). Das Homogenat wurde über Vliseline abfiltriert und der Rückstand in Kernisolierungsmedium nachhomogenisiert. Zur Auflösung der Chloroplasten-Membranen wurden die vereinigten Filtrate mit Triton X-100 (1 % Endkonzentration) für 10 min inkubiert, die Zellkerne für 15 min bei 3.000 Upm in der Christ-Minifuge abzentrifugiert und zur Weiterverar-

beitung in TNS-Medium aufgenommen. Die Isolierung der RNS aus den Zellkernen erfolgte wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

2.4 Charakterisierung der Nukleinsäuren

2.4.1 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNS und RNS

Die Konzentration der DNS- bzw. RNS-Lösung wurde durch die Absorptionsmessung bei 260 nm im Spektralphotometer (Zeiss, PMQ II) gegen das jeweilige Lösungsmittel bestimmt. Dabei wurde 1 optische Dichte, gemessen bei 260 nm (OD_{260}) entsprechend 50 µg/ml DNS bzw. 40 µg/ml RNS gesetzt. Als Reinheitskriterium diente der Extinktionskoeffizient OD_{260}/OD_{280}, der bei einer relativ reinen Nukleinsäure-Lösung 1,85 (DNS) bzw. 2,0 (RNS) beträgt. Eine mögliche Verunreinigung wurde durch die Messung der Absorption bei 310 nm festgestellt und gegebenenfalls vom Absorptionsmaximum bei 260 nm subtrahiert.

2.4.2 Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Zu 10 µl der ^{3}H-Uridin-markierten RNS-Lösung wurden 5 µl Rinderserumalbumin (Stammlösung 10 mg/ml) und 0,5 ml dest. H_2O zugegeben und die RNS mit 150 µl 30 % TCA für 15 min im Eisbad gefällt. Die Proben wurden dann über Nitrocellulosefilter (ø 24 mm, Porengröße 0,45 µ; Fa. Schleicher & Schüll) abgesaugt und zweimal mit je 3 ml 3 % TCA gewaschen. Die Filter wurden unter einer Infrarot-Lampe getrocknet und in 2,5 ml Toluol-Cocktail (1 l Toluol, 4 g PPO, o,1 g POPOP) im Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb 3390, Fa. Packard) gezählt. Aus den cpm pro ml RNS-Lösung und der RNS-Konzentration wurde die spezifische Radioaktivität berechnet und in cpm/µg RNS angegeben.

2.5 Isolierung der Poly(A)-RNS durch die Affinitätschromatographie auf Poly(U)-Sepharose oder Oligo(dT)-Cellulose

Zur Isolierung der Poly(A)-RNS wurde eine Säulenchromatographie entweder auf Oligo(dT)-Cellulose (Aviv und Leder, 1972) oder auf Polu(U)-Sepharose (Lindberg und Persson, 1972) durchgeführt. Für beide Methoden wurden die gleichen Puffer der folgenden Zusammensetzung verwendet:

Bindungspuffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	500 mM	NaCl
	0,2 %	SDS
Elutionspuffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	0,2 %	SDS

Zur Chromatographie auf Oligo(dT)-Cellulose wurden 0,4 g Oligo(dT)-Cellulose (Collaborative Research, Inc.) in Bindungspuffer suspendiert und in eine Säule mit Kühlmantel (ø 12 mm, Länge 12 cm) gepackt.
Zur Poly(U)-Sepharose-Säulenchromatographie wurden 0,5 g Poly(U)-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals) für 10-15 min in 1 M NaCl gequollen und mit 50 ml 0,1 M NaCl gewaschen. Das Gel wurde dann in die Säule gepackt und mit Bindungspuffer äquilibriert.

Die RNS-Probe wurde in Bindungspuffer ohne NaCl aufgenommen und zur Auflösung von RNS-Aggregaten für 3 min bei 60°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die NaCl-Konzentration der RNS-Lösung auf 0,5 M eingestellt. Die Säule wurde dann mit 300-400 µg RNS pro ml Säulenbett beladen und die RNS mit langsamer Durchflußgeschwindigkeit (0,5 ml/min) ausgetropft. Dieser Vorgang der Adsorption wurde insgesamt dreimal wiederholt, um eine möglichst vollständige Bindung der Poly(A)-RNS an das Säulenmaterial zu garantieren. Die nicht Poly(A)-haltige RNS-Fraktion ($Poly(A)^-$-RNS) wurde anschließend mit 15-20 ml Bindungspuffer eluiert und das Säulenbett mit 50 ml Bindungspuffer nachgewaschen. Anschlies-

send wurde die Temperatur auf 40°C gebracht und die Poly(A)-RNS mit 6-8 ml Elutionspuffer eluiert. Die Poly(A)-RNS wurde auf eine Konzentration von 0,5 M Na-acetat eingestellt und beide Eluate mit je 2,5 Volumen 96 % Äthanol ausgefällt.

2.6 Molekulargewichtsbestimmung der RNS

2.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Loening, 1969)

Zur Herstellung von 2,4 % Polyacrylamidgelen wurden zu 5 ml Acrylamid-Stammlösung (15 g Acrylamid, 0,75 g N,N'-Methylenbisacrylamid in 100 ml dest. H_2O), 6,25 ml 5-fach konzentrierter Elektrophoresepuffer (1,8 M Tris-HCl, pH 7,8, 1,5 M NaH_2PO_4, 0,05 M EDTA) und 19,7 ml dest. H_2O zugegeben, die Lösung gemischt und mit einer Vakuumpumpe entlüftet. Die Polymerisation erfolgte durch die Zugabe von 25 µl TEMED und 250 µl 10 % Ammoniumpersulfat. Nach dem Einfüllen der Lösung in Plexiglasröhrchen (ø 6 mm, Länge 12 cm) wurde die Geloberfläche vorsichtig mit dest. H_2O überschichtet. Um störendes UV-absorbierendes Material und geladene Teilchen aus den Gelen zu entfernen, wurde eine Vorelektrophorese für 30 min bei 5 mA/Gel durchgeführt. Anschließend wurde die in 1-fach konzentriertem Elektrophoresepuffer + 10 % Saccharose + 0,2 % SDS gelöste RNS-Probe auf die Gele aufgetragen (10-30 µg RNS/Gel) und die Elektrophorese bei 5 mA/Gel für 2-3 Stunden durchgeführt. (Elektrodenpuffer: 1-fach konzentrierter Elektrophoresepuffer + 0,2 % SDS). Die Gele wurden anschließend in dest. H_2O äquilibriert, im UV-Scanner (Fa. Joyce-Loebl) bei 256 nm gemessen, danach in Trockeneis eingefroren und mit einem Gel-Slicer (Fa. Joyce-Loebl) in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten. Jedes Scheibchen wurde in ein Szintillationsgläschen gegeben und die RNS mit 0,5 ml 12,5 % Ammoniak über Nacht alkalisch hydrolysiert. Die Radioaktivität

wurde nach der Zugabe von jeweils 3,5 ml Unisolve (Koch Light Laboratories, LTD) im Szintillationszähler gemessen. Das Molekulargewicht der einzelnen RNS-Komponenten wurde im UV-Absorptionsprofil bzw. Radioaktivitätsdiagramm nach der Methode von Loening (1969) bestimmt, wonach eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsstrecke der RNS im Gel und dem Logarithmus des Molekulargewichts besteht. Als Molekulargewichtsstandard wurde die ribosomale 16S und 23S RNS aus E.coli verwendet.

2.6.2 Formamid-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Grierson und Hemleben, 1977)

Für 4 % Formamid-Polyacrylamidgele wurde zunächst eine Lösung der folgenden Zusammensetzung hergestellt: 0,91 g Acrylamid, 0,091 g N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,25 ml 1 M Na_2HPO_4, pH9,0 (Endkonzentration 10 mM), 20 ml 98 % Formamid (deionisiert durch Behandlung mit Amberlite für 2 Stunden unter ständigem Rühren) und 60 µl TEMED. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 9,0 eingestellt und mit 98 % Formamid auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Die Polymerisation erfolgte durch die Zugabe von 200 µl 18 % Ammoniumpersulfat. Während des Polymerisationsvorganges in den Plexiglasröhrchen wurde die Geloberfläche mit 70 % gepuffertem Formamid (10 ml 70 % Formamid + 100 µl 1 M Na_2HPO_4) überschichtet; nach 30 min wurde diese Schicht durch 98 % gepuffertes Formamid ersetzt. Die in 98 % gepuffertem Formamid + 10 % Saccharose gelöste RNS-Probe wurde für 3 min bei 50 ^{o}C erhitzt und auf die Gele aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei 3-4 mA/Gel für 3-4 Stunden (Elektrodenpuffer: 10 mM Na_2HPO_4, pH 9,0) wurden die Gele für 1 Stunde in dest. H_2O gewaschen. Die densitometrische Auswertung und die weitere Aufarbeitung der Gele erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben.

2.7 Radioaktive Markierung der Poly(A)-RNS und Poly(A)$^-$-RNS mit ^{125}Jod (nach Getz et al., 1972; Orosz und Wetmur, 1974)

In den Fällen, in denen keine radioaktive Markierung in-vivo durchgeführt wurde, wurde die Poly(A)-RNS bzw. die Poly(A)$^-$-RNS zunächst isoliert und anschließend in-vitro mit ^{125}Jod radioaktiv markiert. Dazu wurde die RNS in einem Maximalvolumen von 1 ml dest. H_2O gelöst und über Nacht gegen dest. H_2O dialysiert, um eine salz- und ionenfreie Lösung zu erhalten. Zur Jodierung wurde bei 4°C das folgende Inkubationsgemisch hergestellt:

	Stammlösung	Endkonzentration	ml Stammlösung pro Ansatz
KJ	10^{-3} M	5 x 10^{-6} M	0,030 ml
Na-acetat/ H-acetat	1 M/ 0,04 M	0,1M/0,004 M	0,300 ml
$TlCl_3$	0,1 M	5 x 10^{-4} M	0,015 ml
RNS	60 µg/ml		1,000 ml
^{125}Jod	10 mCi/ml	0,66 mCi/ml	0,020 ml
H_2O			1,635 ml
			3,000 ml

Das Inkubationsgemisch wurde für 30 min bei 60 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung für wenige Minuten im Eisbad abgekühlt und 0,15 ml frisch angesetztes 0,1 M Na_2SO_3 und 0,3 ml 1 M Na-acetat + 1 M NH_4OH zugegeben und erneut für 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf eine mit dest. H_2O äquilibrierte Sephadex G-25 - Säule aufgetragen und mit dest. H_2O in 0,3 ml-Fraktionen eluiert. Jede Fraktion wurde auf ihren Gehalt an Radioaktivität überprüft, indem 10 µl jeder Fraktion auf einen Nitrocellulosefilter gegeben wurde. Die Filter wurden getrocknet und im Szintillationszähler (Kanal A = ^{125}Jod-Kanal; Fa. Beckman) gemessen.

Die ^{125}Jod-RNS-Fraktionen wurden vereinigt, mit 1 x SSC (Standard Saline Citrat = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citrat, pH 6,7) auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt, mit 20 µg/ml Pronase bei 37 °C für 30 min inkubiert und die ^{125}Jod-RNS anschließend mit Kirby-Mix : Chloroform (1:1) und Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, Na-acetat (0,5 M Endkonzentration) zugegeben und mit 96 % Äthanol ausgefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70 % Äthanol gewaschen, getrocknet, in 2 x SSC gelöst und die spezifische Radioaktivität bestimmt.

2.8 Sättigungshybridisierung von Gesamt-DNS und Poly(A)-RNS mit der Filtertechnik (nach Gillespie und Spiegelman, 1965; Grierson und Hemleben, 1977)

2.8.1 Fixierung der DNS auf Nitrocellulosefiltern

Für die Hybridisierung mit der Filtertechnik wurden Nitrocellulosefilter (ø 13 mm, Porengröße 0,45 µ; Fa. Millipore) in 2 x SSC eingeweicht und in Hybridisierungsröhrchen zwischen Sieb und Dichtungsring eingeschraubt. Die vereinigten DNS-Fraktionen aus einem neutralen CsCl-Gradienten oder die einzelnen Fraktionen eines Actinomycin-CsCl-Gradienten wurden mit Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5 auf ein definiertes Volumen aufgefüllt, mit 1 Volumen 1 N NaOH für 30 min bei Raumtemperatur denaturiert und anschließend mit 4 Volumen Neutralisationsmedium (1 M Tris-HCl, pH 8,3 : 1 N HCl : 3 M NaCl = 1 : 1 : 2) neutralisiert. Von diesem Gemisch wurde in die Hybridisierungsröhrchen ein Volumen entsprechend 20 µg DNS pro Röhrchen einpipettiert und die DNS ohne Druck auf die Filter fixiert. Die Filter wurden anschließend im Vakuumofen bei 80 °C für 2 Stunden getrocknet.

2.8.2 Sättigungshybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS

In den Hybridisierungsexperimenten mit einer Vorhybridisierung wurden die DNS-Filter zunächst für 3 Stunden bei 65 °C mit 50 µg/ml unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS in 6 x SSC + 0,1 % SDS inkubiert und anschließend mehrmals in 6 x SSC und 2 x SSC gewaschen. Die eigentliche Hybridisierungsreaktion wurde mit 15 µg/ml ^{3}H- oder 15 µg/ml ^{125}Jod-Poly(A)-RNS in 6 x SSC + 0,1 % SDS bei 67 °C durchgeführt. Pro Meßwert wurden je zwei DNS-Filter und ein Blindwert (Filter ohne DNS) in der Poly(A)-RNS-Lösung für die angegebenen Zeiten inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter für je 10 min mit RNase A (2o µg/ml in 2 x SSC) bei 37 °C inkubiert und abschließend dreimal mit 2 x SSC für jeweils 10 min gewaschen. Bei der mit ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenin markierten RNS wurde nach der Hybridisierung mit je 2o µg/ml RNase A und RNase T_1 inkubiert, und die Filter wie oben gewaschen. Nach dem Trocknen der Filter wurde die Radioaktivität auf jedem Filter in Toluol-Cocktail im Szintillationszähler (Tricarb 3390, Fa. Packard) gemessen.

2.8.3 DNS-Bestimmung auf den Filtern
(nach Ingle et al., 1975)

Nach der Bestimmung ihres Radioaktivitätsgehaltes wurden die Filter gründlich in Chloroform gewaschen, getrocknet und die DNS mit 1 N HCl bei 100 °C für 10 min hydrolysiert. Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm (Zeiss, PMQ II) mit der DNS aus Heringssperma (Fa. Serva) als Standard.

2.8.4 Anpassung an Sättigungskurven

Die Hybridbildung zwischen DNS und Poly(A)-RNS wurde in Prozent (%) gegen die Zeit t in (h) aufgetragen. Die so erhaltene Kurve wurde mit Hilfe eines TI-59-Rechners (Texas-Instruments) durch

eine lineare Regression der doppelt reziproken Zeit- und Hybridisierungswerte an eine Sättigungskurve nach folgender Formel angepaßt:

$$H = \frac{H_{max} \times t}{T_{1/2} + t}$$

H = % Hybridisierung zur Zeit t
H_{max} = Sättigungswert der Hybridisierung in %
t = Hybridisierungszeit (h)
$T_{1/2}$ = Zeitwert der Halbsättigung, zu dem 50 % Hybridisierung stattgefunden hat;

bei $T_{1/2}$ gilt $H = \frac{H_{max}}{2}$

2.9 Hybridisierung von Restriktionsfragmenten der DNS mit Poly(A)-RNS und Poly(A)$^-$-RNS

2.9.1 Abbau der DNS mit Restriktionsenzymen

Die Gesamt-DNS, die über einen neutralen CsCl-Gradienten gereinigt worden war, wurde mit den Restriktionsendonukleasen Bst I (≙ Bam H I) und Eco R I (Fa. Böhringer) jeweils in einem Einzelabbau abgebaut. Bst I wurde von Dr. R.B. Meagher, Department of Microbiology and Botany, University of Georgia, zur Verfügung gestellt.
Folgende, als 10-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzte Inkubationspuffer wurden verwendet:

Bst I - Inkubationspuffer (10 x)

500 mM NaCl
60 mM $MgCl_2$
60 mM Tris-HCl, pH 7,4
60 mM 2-Mercaptoäthanol
1 mg/ml BSA

Eco R I - Inkubationspuffer (10 x)

500 mM NaCl
100 mM $MgCl_2$
100 mM Tris-HCl, pH 7,5

Hind III- Inkubationspuffer (10 x)

600 mM NaCl
70 mM $MgCl_2$
70 mM Tris-HCl, pH 7,4

Für den Restriktionsabbau wurden in einem Endvolumen von 50 µl jeweils 2 µg DNS im entsprechenden Inkubationspuffer mit jeweils 10 Enzymeinheiten bei 37 °C für 60 min in Eppendorf-Reaktionsgefäßen inkubiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde die DNS des Phagen λ verwendet und mit dem Restriktionsenzym Hind III abgebaut. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von jeweils 5 µl Stop-Mix (5 % SDS, 50 % Glycerin, 0,025 % Bromphenolblau) und nach weiterer Inkubation für 10 min bei 70 °C beendet.

2.9.2 Agarose-Gelelektrophorese der abgebauten DNS (nach Schaffner et al., 1976)

In die vorbereitete Gelapparatur (Spacerbreite 2 mm) wurde als untere Begrenzung des Gels und als Auslaufschutz eine etwa 2 cm hohe Schicht aus 1,5 g Cyanogum (Fa. Serva) in 10 ml 1-fach konzentriertem Elektrophoresepuffer (1 x E-Puffer: 36 mM Tris-HCl, pH 7,6, 30 mM NaH_2PO_4, 2 mM EDTA) eingefüllt und durch die

Zugabe von 20 µl TEMED und wenigen Kristallen Ammoniumpersulfat auspolymerisiert. Zur Herstellung des 1 % Agarosegels wurde die Agarose (Fa. Seakam)in 1 x E-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf 65 °C zwischen die Glasplatten der Gelapparatur eingefüllt und der Geltaschenkamm eingesetzt. Nach dem völligen Auskühlen des Gels wurden beide Puffervorratsbecken mit 1 x E-Puffer gefüllt, der Geltaschenkamm entfernt und das Gel in die Apparatur eingesetzt. Dem Auftrag der DNS-Proben folgte eine Start-Elektrophorese bei 150 mA für 10-15 min und die Haupt-Elektrophorese bei 40 Volt für ca. 10 Stunden unter ständiger Zirkulation des Elektrodenpuffers.

2.9.3 Elution der DNS-Fragmente und Hybridisierung mit ^{125}Jod-Poly(A)-RNS und ^{125}Jod-Poly(A)$^-$-RNS (Southern, 1975)

Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel in Doppeltaschenstreifen geschnitten. Die Marker-Gelstreifen mit der Hind III-abgebauten λ-DNS wurden für 30 min in einer Äthidiumbromidlösung (3 µg/ml) gefärbt und anschließend mit einer Polaroidkamera unter UV-Licht fotographiert. Die Probengelstreifen mit den DNS-Fragmenten wurden für 20 min in 250 ml Denaturierungsmedium (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) leicht geschüttelt, dreimal mit dest. H_2O gewaschen und für 50 min mit Neutralisationsmedium (3 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,6) unter leichtem Schütteln behandelt. Die Elution der DNS-Fragmente auf Nitrocellulose-Filterstreifen (Fa. Millipore) wurde für 18-20 Stunden nach der Methode von Southern (1975) durchgeführt, die Filterstreifen getrocknet und einzeln in die Kammern der Hybridisierungsbox eingelegt. Ein Teil der Filterstreifen wurde mit 2,5 µg/ml unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS in 6 x SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C für 3 Stunden vorhybridisiert, anschließend mehrmals in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und wieder in die Hybridisierungsbox eingelegt.
In jede Kammer wurden anschließend 10 ml des Hybridisierungs-

gemisches (25 % Formamid in 6 x SSC, 1,0 µg/ml ^{125}Jod-RNS) eingefüllt. Die Hybridisierung erfolgte für 24 Stunden bei 60 °C. Danach wurden die Filterstreifen aus den Kammern herausgenommen, dreimal mit 2 x SSC für jeweils 10 min gewaschen, mit RNase A (20 µg/ml in 2 x SSC) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, noch dreimal für je 10 min mit 2 x SSC gewaschen und für mehrere Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Filterstreifen wurden anschließend in Parafilm eingefaßt und auf beiden Seiten je ein Röntgenfilm ("Kodirex", Fa. Kodak) für 2-4 Wochen exponiert. Die Filme wurden mit Kodak D 19-Entwickler entwickelt.

2.10 Isolierung von Proteinen aus Blütenblättern von M.incana durch die Fällung mit Ammoniumsulfat

Die Blütenblätter der M.incana-Stämme o4, 06 und 17 wurden mit dem Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel) in 0,06 M Na_2HPO_4, pH 7,4, aufgeschlossen und der Extrakt über Vliseline abfiltriert. Das Filtrat wurde bei 10.000 Upm für 30 min (GSA-Rotor, Sorvall) zentrifugiert und der Überstand bei -60 °C eingefroren.
Nach dem Auftauen wurde der Überstand noch einmal für 30 min bei 10.000 Upm zentrifugiert und anschließend für 24 Stunden gegen dest. H_2O dialysiert. Die Fällung der Proteine erfolgte schrittweise bei 4 °C von 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80% und 80-100% Ammoniumsulfat durch die langsame Zugabe der entsprechenden Mengen $(NH_4)_2SO_4$ (nach dem Nomogramm von Dixon, 1953) unter ständigem Rühren. Nach jedem Fällungsschritt wurde bei 15.000 Upm (SS 34 - Rotor, Sorvall) für jeweils 20 min abzentrifugiert, das Sediment in 0,06 M Na_2HPO_4, pH 7,4, aufgenommen und für 24 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert.
Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Fällungsschritten wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt.

Die Elektrophorese der Proteine in 10-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen erfolgte wie unter 2.11.1.4 beschrieben. Die Gele wurden anschließend für 30 min mit Coomassie-Blue gefärbt, dann entfärbt, mit einer Polaroidkamera fotographiert und auf einem Geltrockner (Fa. Schütt, Göttingen) bei 95 °C für 2-3 Stunden getrocknet.

2.11 In-vitro-Proteinsynthese

2.11.1 In-vitro-Proteinsynthese im Weizenkeim-System (Roberts und Paterson, 1973)

2.11.1.1 Präparation des zellfreien Proteinsynthese-Systems aus Weizenkeimen

Zur Präparation des 30.000 x g - Überstandes (S-30-Fraktion) wurden 6 g Weizenkeime ("Bar Rav"-Mühle, Tel Aviv, Israel) und 6 g steriler Sand (oder Glaspulver) mit 17 ml Aufschluß-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,6 eingestellt mit KOH, 100 mM KCl, 1 mM Mg-acetat, 2 mM $CaCl_2$, 6 mM 2-Mercaptoäthanol) in einem Mörser bei 4 °C homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 30.000 x g entsprechend 16.000 Upm im SS-34-Rotor (Sorvall) bei 0-2 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand (S-30-Fraktion) abgenommen. Die S-30-Fraktion wurde anschließend auf 3,5 mM Mg-acetat eingestellt (25 µl 100 mM Mg-acetat pro ml S-30-Fraktion) und mit 1 mM ATP, 20 µM GTP, 2 mM DTT, 8 mM Creatinphosphat und 40 µg/ml Creatin-Kinase bei 30 °C für 12-15 min inkubiert. Anschließend wurde die S-30-Fraktion auf eine mit Säulen-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,6, 120 mM KCl, 5 mM Mg-acetat, 6 mM 2-Mercaptoäthanol) äquilibrierte Sephadex G-25-Säule aufgetragen und mit Säulen-Puffer in 1-ml-Fraktionen eluiert. Die den Weizenkeim-Extrakt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, auf eine Konzentration von 80 OD/ml eingestellt und in flüssigem Stickstoff oder bei -70 °C eingefroren.

2.11.1.2 In-vitro-Proteinsynthese im Weizenkeim-System

Das Inkubationsgemisch mit einem Endvolumen von 25 µl enthielt 5 µl Weizenkeim-Extrakt, 20 mM Hepes, pH 7,6, 2 mM Mg-acetat, 76 mM K-acetat, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 20 µM GTP, 8 mM Creatinphosphat, 40 µg/ml Creatin-Kinase, 50 µM Spermin, 25 µM einer Lösung aus 19 Aminosäuren (ohne Methionin), 10 µCi ^{35}S-Methionin (spez. Radioaktivität 40-500 Ci/mmol) und 0,5-5,0 µg Poly(A)-RNS bzw. 2,0-4,0 µg Poly(A)$^-$-RNS. Dieses Reaktionsgemisch wurde bei 25 ^{o}C für 90 min inkubiert. Zur Kontrolle wurden anschließend aus jedem Ansatz 5 µl entnommen und auf Whatman 3MM-Filter pipettiert. Die Filter wurden getrocknet, in 10 % TCA überführt, dann für 10-15 min in 5 % TCA gekocht, zweimal mit 5 % TCA, dann mit Äthanol : Äther (2:1) und Äther gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität der Filter im Szintillationszähler(Tricarb 3390, Fa. Packard) gemessen.

2.11.1.3 In-vitro-Proteinsynthese im Reticulocyten-System

Das Kaninchen-Reticulocyten-Lysat (Nuklease-behandelt, Messenger-RNS-abhänig; Fa. Amersham-Buchler) war nach der Methode von Pelham und Jackson (1976) präpariert und enthielt bereits alle zur In-vitro-Proteinsynthese notwendigen Substanzen, ausgenommen die radioaktiv markierte Aminosäure und die zu testende RNS.
In den Inkubationsmix wurden je 10 µl Reticulocyten-Lysat und 2,5 µl ^{35}S-Methionin (entsprechend 25 µCi) einpipettiert, die Reaktion durch die Zugabe von 0,5 µg oder 1 µg Poly(A)-RNS gestartet und bei 30 ^{o}C für 60 min inkubiert. Der Kontrollansatz enthielt anstelle der Poly(A)-RNS die entsprechende Menge dest. H_2O.

2.11.1.4 Elektrophorese der Translationsprodukte in SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen

Die Produkte der In-vitro-Proteinsynthese wurden durch die Gelelektrophorese in 10-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen nach Laemmli (1970) charakterisiert. Als Proteinstandard diente ein Proteingemisch aus Proteinen von bekanntem Molekulargewicht (Fa. Pharmacia Fine Chemicals). Zu den Proben wurde jeweils 1 Volumen Probenpuffer (10 ml Probenpuffer enthielten 3 ml Glycerin, 1,5 ml 2-Mercaptoäthanol, 0,9 g SDS, 3,75 ml Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M + 0,4 % SDS) und 50 µl 0,1 % Bromphenolblau) gegeben, das Gemisch 1-2 min im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 140 Volt für 4-5 Stunden durchgeführt.

2.11.1.5 Färben der Gele und Fluorographie

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min mit Coomassie-Blue (0,2 % Coomassie Brillant Blue, 50 % Methanol, 7 % Eisessig) gefärbt und mit Entfärber-Lösung (20 % Methanol, 7 % Eisessig) über Nacht entfärbt. Danach wurden die Gele zweimal für jeweils 30 min in DMSO und für 3 Stunden in PPO-DMSO (22,2 % w/v) unter leichtem Schütteln behandelt, 45 min unter fließendem Wasser gewaschen und auf einem Geltrockner (Fa. Schütt, Göttingen) bei 95 ^{o}C unter Vakuum getrocknet. Auf den Gelen wurde anschließend ein Röntgenfilm ("Kodirex", Fa. Kodak) für 10-30 Tage bei -70 ^{o}C exponiert und dieser mit Kodak D-19-Entwickler entwickelt.

2.12 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Substanzen und Chemikalien des Reinheitsgrades p.A. wurden von der Fa. Merck, Darmstadt,bezogen.

Enzyme:

Creatin-Kinase aus Kaninchenmuskel, EC 2.7.3.2, Fa. Böhringer
DNase I aus Rinderpankreas, Reinheitsgrad I, EC 3.1.21.1, Fa. Böhringer
Pronase P aus Streptomyces griseus, EC 3.4.24.4, Fa. Serva
RNase A aus Rinderpankreas, EC 3.1.27.5, Fa. Böhringer
RNase T_1 aus Aspergillus oryzae, EC 3.1.27.3, Fa. Böhringer

Restriktionsendonukleasen:

Bst I (Bam H I) wurde von Dr. R.B. Meagher, Department of Microbiology and Botany, University of Georgia, zur Verfügung gestellt.
Eco R I aus Escherichia coli BS 5, EC 3.1.23.13, Fa. Böhringer
Hind III aus Haemophilus influenza Rd com^{-10}, EC 3.1.23.21, Fa. Böhringer

Actinomycin D	Fa. Serva
Acrylamid	Fa. Serva
Äthidiumbromid	Fa. Serva
Agarose	Fa. Seakam
Amberlite	Fa. Serva
Ammoniumpersulfat	Fa. Serva
BSA	Fa. Calbiochem
Creatinphosphat	Fa. Böhringer
Cyanogum	Fa. Serva
Desoxyribonukleosid-triphosphate	Fa. Böhringer
DNS aus Heringssperma	Fa. Serva

Hepes-Puffersubstanz	Fa. Serva
2-Mercaptoäthanol	Fa. Serva
N,N'-Methylenbisacrylamid	Fa. Sigma
Oligo(dT)-Cellulose	Fa. Collaborative Research
PAS	Fa. Schuchardt
Poly(U)-Sepharose	Fa. Pharmacia Fine Chemicals
POPOP	Fa. Packard
PPO	Fa. Packard
SDS	Fa. Serva
Sephadex G-25 (fine)	Fa. Pharmacia Fine Chemicals
Spermin	Fa. Böhringer
TEMED	Fa. Serva
Unisolve	Fa. Koch Light Laboratories

Radioaktive Substanzen:

Alle radioaktiven Substanzen wurden von der Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

(8'-^{3}H)-Adenin, spez. Radioakt. 22 Ci/mmol
(5'-^{3}H)-Uridin, spez. Radioakt. 27 Ci/mmol
L-(^{35}S)-Methionin, spez. Radioakt. 40-500 Ci/mmol
^{125}Jod, 100 mCi/ml

2.13 Abkürzungen

A_{260}	Absorption bei 260 nm
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
Ci	Curie
cpm	counts pro min
D	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
M	Molarität
mA	Milliampère
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mRNS	Messenger-RNS
N	Normalität
nm	Nanometer
NT	Nukleotide
OD	Optische Dichte
Oligo(dT)	Oligo-desoxythymidylsäure
PAS	p-Amino-salicylsaures Natriumsalz
pg	Picogramm
Poly(A)	Polyadenylsäure
Poly(U)	Polyuridylsäure
POPOP	1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure

rRNS	ribosomale RNS
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard Saline Citrat
Std.	Stunde
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Ti	Titan
TNS	Tri-iso-propylnaphthalen-sulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
Upm	Umdrehungen pro min
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

3. ERGEBNISSE

3.1 Isolierung der Poly(A)-RNS

Die Isolierung der Poly(A)-RNS wird entscheidend dadurch erleichtert, daß ein Teil der mRNS-Moleküle in Eukaryonten an ihrem 3'-Ende eine Poly(A)-Sequenz trägt (Brawerman, 1974). Dadurch wird mit der Methode der Affintitätschromatographie an Poly(U)-Sepharose (Lindberg und Persson, 1972) oder Oligo(dT)-Cellulose (Aviv und Leder, 1972) eine annähernd quantitative Fraktionierung der RNS in Poly(A)-haltige RNS und nicht-polyadenylierte RNS ermöglicht.
Das Interesse galt zunächst der Isolierung einer Poly(A)-RNS, die folgenden Kriterien genügen sollte: Erstens sollte sie möglichst frei von Verunreinigungen durch ribosomale RNS-Komponenten sein, zum anderen sollte ihre biologische Aktivität erhalten und in einem zellfreien Proteinsynthese-System überprüfbar sein.

Zu diesem Zweck wurden zunächst die Gesamt-Nukleinsäuren aus Keimlingen oder aus Blüten von M.incana isoliert, die DNS mit DNase abgebaut und die RNS zu erster Reinigung mehrfach repräzipitiert. Alternativ zum enzymatischen Abbau wurde in einigen Experimenten die DNS von der RNS durch die Zentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Gradienten abgetrennt. Bei dieser Methode werden neben der RNS auch eventuell noch vorhandene Proteine und Polysaccharide entfernt. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß durch die hohe Salzkonzentration die RNS in einem teilweise hoch aggregierten Zustand vorliegt, was in der nachfolgenden Affinitätschromatographie auf einer Poly(U)-Sepharose-Säule oder Oligo(dT)-Cellulose-Säule zu einer raschen Verstopfung des Säulenmaterials führen kann. Dies kann weitgehend dadurch verhindert werden, daß die RNS-Präparation vor der Adsorption an das Säulenbett zur Auflösung der Molekülaggregate kurz auf 60 ^{o}C erhitzt wird.
Die auf diese Weise vorbehandelte RNS wurde dann durch die Affi-

nitätschromatographie in die Poly(A)$^-$-RNS und die Poly(A)-RNS fraktioniert. Da Cellulose offensichtlich eine höhere unspezifische Bindung für Nukleinsäuren besitzt (Pharmacia, 1974), wurden in den meisten Versuchen Poly(U)-Sepharose-Säulen benutzt.

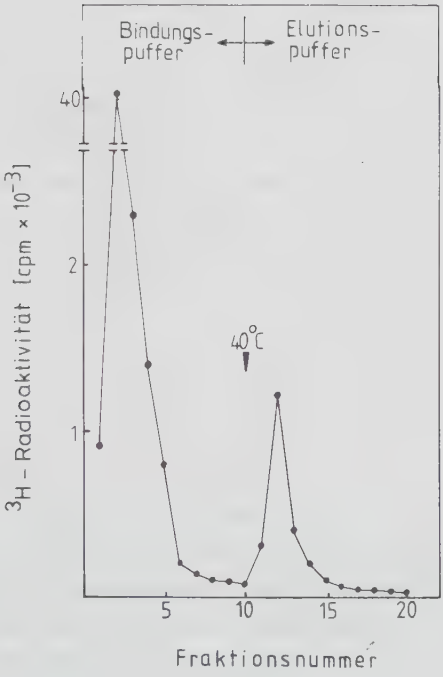


Abb. 1: Elutionsprofil von ^{3}H-Uridin-markierter RNS aus M.incana-Keimlingen über eine Poly(U)- Sepharose-Säule. Die Keimlinge wurden mit 100 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin für 24 Std. vom 3.-4. Keimungstag radioaktiv markiert. Poly(A)$^-$-RNS und Poly(A)-RNS wurden mit dem jeweiligen Puffer in 2-ml-Fraktionen eluiert und der Radioaktivitätsgehalt der Fraktionen gemessen.

Um eine möglichst vollständige Elution der Poly(A)-RNS vom Säulenmaterial zu erhalten, wurde im Anschluß an die Elution der Poly(A)$^-$-RNS mit Bindungspuffer sowohl das Säulenbett als auch der Elutionspuffer auf 40 ^{o}C gebracht und diese Temperatur bis zum Ende des Elutionsvorganges beibehalten. Eine unter diesen Bedingungen durchgeführte Affinitätschromatographie ergibt eine Wiedergewinnung der eingesetzten RNS-Menge von 80-90 %, wobei der Anteil der Poly(A)-RNS an der Gesamt-RNS durchschnittlich 1-2 % beträgt (Abb. 1). Wurde dieser Wert erheblich überschritten, was mit größter Wahrscheinlichkeit auf eine starke Verunreinigung durch ribosomale RNS zurückzuführen ist, wurde die Poly(A)-RNS nach erneuter Hitzebehandlung durch einen zweiten Lauf über Oligo(dT)-Cellulose bzw. Poly(U)-Sepharose gereinigt. Eine solche Refraktionierung ergibt eine Rückgewinnung der eingesetzten Poly(A)-RNS-Menge von etwa 50-60 %. Jedoch konnte auch unter diesen Umständen keine Poly(A)-RNS gewonnen werden, die völlig frei von ribosomalen RNS-Komponenten ist. Inwie weit diese Verunreinigung, die durchschnittlich 5-10 % betrug, die Hybridisierungsexperimente von DNS und Poly(A)-RNS beeinflussen kann, ist in Kapitel 3.4.1 ausführlich dargestellt.

3.2 Bestimmung des Molekulargewichts der RNS

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der einzelnen RNS-Komponenten und ihrer Größenverteilung wurden sowohl die Poly(A)$^-$-RNS als auch die Poly(A)-RNS durch die Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen und Formamid-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und charakterisiert.

3.2.1 Molekulargewicht der Poly(A)$^-$-RNS

Die elektrophoretische Charakterisierung wurde zunächst mit der Poly(A)$^-$-RNS durchgeführt, die hauptsächlich aus der ribosomalen

25S und 18S RNS und weiter aus der 5S RNS und der tRNS besteht, und die auch jenen Anteil der mRNS enthält, der keine Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende des Moleküls besitzt.
Abbildung 2a zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Poly(A)$^-$-RNS aus Licht-Keimlingen, die mit 100 µCi/ml ^{3}H-Uridin für 24 Stunden vom 3.-4. Keimungstag radioaktiv markiert worden waren, auf einem 2,4 % Polyacrylamidgel. Im Radioaktivitätsprofil zeigen sich zwei distinkte Peakfraktionen, die als die ribosomalen 25S und 18S RNS zu identifizieren sind und deren Molekulargewichte von 1,3 x 10^6Dalton (25S rRNS) und 0,7 x 10^6 Dalton (18S rRNS) in guter Übereinstimmung mit den Werten sind, die normalerweise für die ribosomale RNS höherer Pflanzen angenommen werden (Loening, 1968; Grierson und Hemleben, 1977).
Zwei weitere Komponenten, deren Größe mit derjenigen der als Marker verwendeten rRNS aus E.coli (23S und 16S) übereinstimmt, repräsentieren die ribosomale RNS aus Chloroplasten. Die kleinen Komponenten der Poly(A)$^-$-RNS, wie etwa die 5S rRNS und die tRNS, werden in 2,4 % Polyacrylamid aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichtes nicht erfaßt.

Das Radioaktivitätsprofil der gleichen Poly(A)$^-$-RNS auf einem 4 % Formamid-Polyacrylamidgel ist in Abbildung 2b dargestellt. Formamidgele haben gegenüber Polyacrylamidgelen den Vorteil, daß schon geringe Unterschiede im Molekulargewicht der einzelnen Komponenten festgestellt werden können. Diese Trenngenauigkeit kommt dadurch zustande, daß aufgrund der denaturierenden Wirkung von Formamid sowohl intermolekulare Aggregationen aus auch Konformationseffekte, die auf die Sekundärstruktur der Moleküle zurückzuführen sind, verhindert werden können. Unter diesen denaturierenden Bedingungen einer Formamid-Behandlung ist jedoch die 25S rRNS instabil und zerfällt teilweise in kleinere Komponenten. Das Molekulargewicht der 25S und 18S rRNS, berechnet aus der Mobilität im Gel relativ zur E.coli-rRNS (Loening, 1969), beträgt unter diesen Bedingungen 1,25 x 10^6 Dalton bzw. 0,64 x 10^6 Dalton. Diese hier gefundenen Werte stimmen gut mit jenen überein, die von

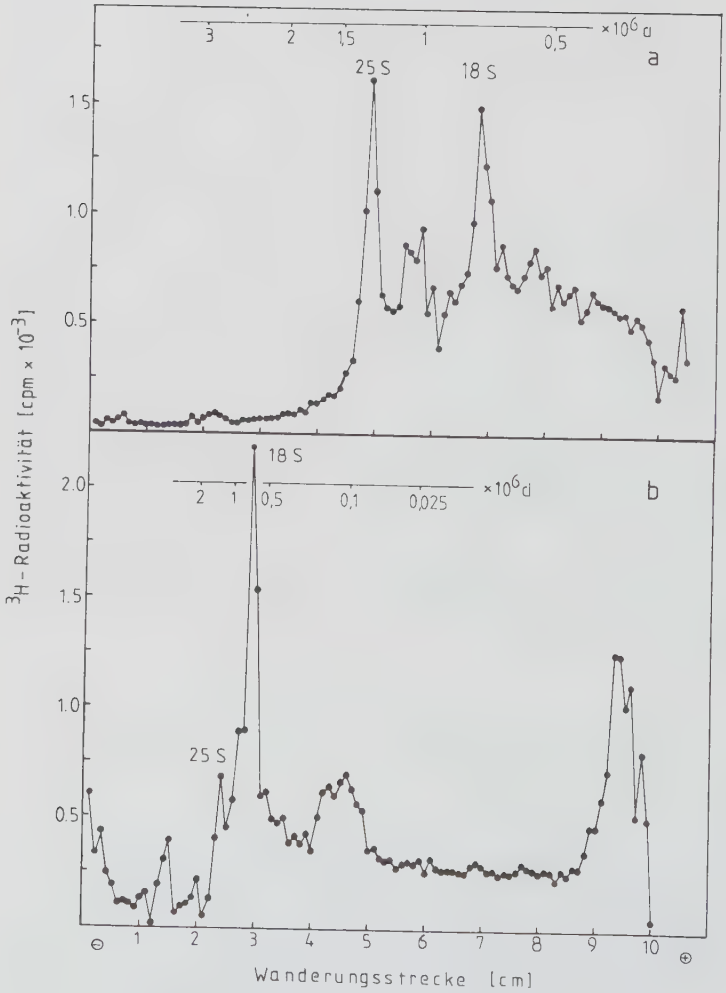


Abb. 2: Gelelektrophorese von Poly(A)$^-$-RNS aus M.incana-Keimlingen, in-vivo radioaktiv markiert mit 100 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin für 24 Std. vom 3.-4. Keimungstag.
Elektrophorese von jeweils 20 µg Poly(A)$^-$-RNS auf a) 2,4 % Polyacrylamidgelen und auf b) 4 % Formamid-Polyacrylamidgelen.

Grierson und Hemleben (1977) unter den gleichen Bedingungen für die ribosomale RNS aus M.incana gefunden wurden.

3.2.2 Molekulargewicht der Poly(A)-RNS

Abbildung 3 zeigt die elektrophoretische Auftrennung einer Poly(A)-RNS-Population aus Licht-Keimlingen, die mit 100 µCi/ml ^{3}H-Uridin für 24 Stunden vom 3.-4. Keimungstag radioaktiv markiert worden waren.
In 2,4 % Polyacrylamid (Abb. 3a) verteilt sich die Poly(A)-RNS über das gesamte Gel von hohen bis zu sehr niedrigen Molekulargewichtsbereichen. Im Gegensatz dazu wandert die Poly(A)-RNS im 4 % Formamid-Polyacrylamidgel (Abb. 3b) zwar immer noch in einem relativ breiten, jedoch distinkten Molekulargewichtsbereich. Ausgehend von den Molekulargewichten der Marker-RNS aus E.coli, die unter diesen denaturierenden Bedingungen 1,05 x 10^6 Dalton und 0,52 x 10^6 Dalton betragen (Spohr et al., 1976), errechnet sich für das Molekulargewicht der Poly(A)-RNS ein durchschnittlicher Wert von 3,9 x 10^5 Dalton, was einer mittleren Länge von 1.200 Nukleotiden entspricht. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem bereits von Grierson und Hemleben (1977) berichteten Molekulargewicht von 4 x 10^5 Dalton für die Poly(A)-RNS aus den Wurzeln und Kotyledonen von M.incana-Keimlingen.

Eine größere Fraktion von relativ kleinen Molekülen der Poly(A)-RNS-Population, die sich in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 1,5 x 10^5 Dalton sammeln, läßt darauf schließen, daß die Formamid-Behandlung, ähnlich wie bei der 25S rRNS (Abb. 2b), eine Fragmentierung der Poly(A)-RNS-Moleküle in kleinere Komponenten versacht. Möglicherweise ist daher sowohl das hier berechnete als auch das von Grierson und Hemleben (1977) angegebene Molekulargewicht von 3,9 x 10^5 Dalton bzw. 4 x 10^5 Dalton zu niedrig.

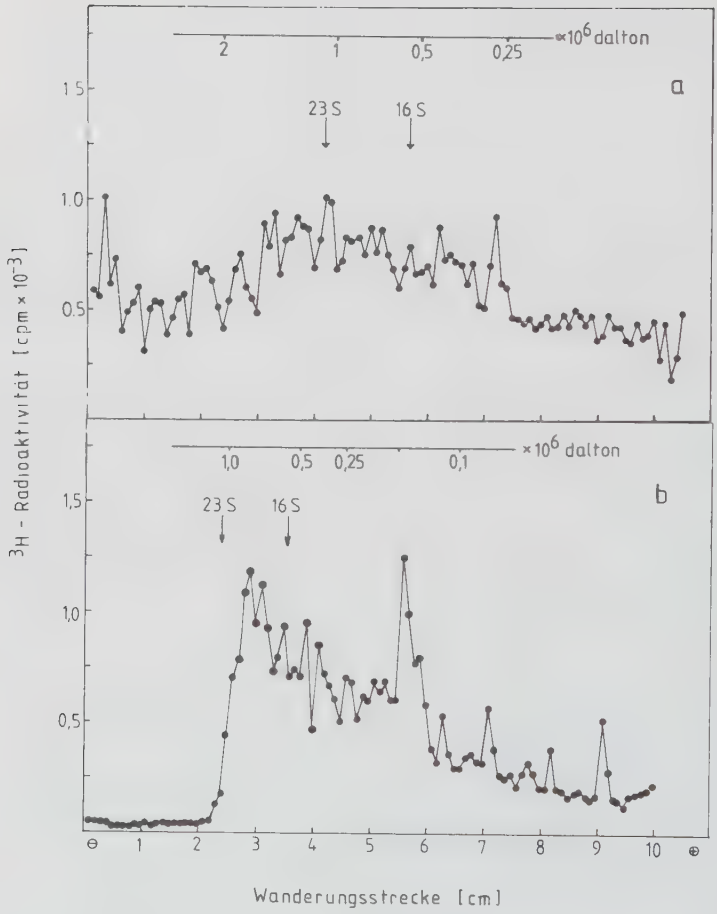


Abb. 3: Gelelektrophorese von jeweils 20 µg Poly(A)-RNS aus M.incana-Keimlingen, in-vivo radioaktiv markiert mit 100 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin für 24 Std. vom 3.-4. Keimungstag. Elektrophorese auf a) 2,4 % Polyacrylamid und auf b) 4 % Formamid-Polyacrylamid.

3.3 Transkriptionsraten von Gesamt-RNS und Poly(A)-RNS

Vergleicht man die Einbaurate von ^{3}H-Uridin bzw. die spezifischen Radioaktivitäten der Gesamt-RNS in Keimlingen, die entweder im Licht oder im Dunkeln angezogen wurden, so zeigt sich, daß die Transkriptionsrate in Licht-Keimlingen höher ist als in Dunkel-Keimlingen.
Abbildung 4 zeigt, daß die für die Syntheserate der Gesamt-RNS gefundenen Verhältnisse auch für die Synthese der Poly(A)-RNS gelten. Dargestellt sind die Poly(A)-RNS-Populationen aus Keimlingen, die im Licht (Abb. 4a) bzw. im Dunkeln (Abb. 4b) angezogen und am 2. Keimungstag mit 100 µCi/ml ^{3}H-Uridin für 4 Stunden radioaktiv markiert wurden. Ein Vergleich der spezifischen Radioaktivität von 3.900 cpm/µg (Licht-Keimlinge) und 2.800 cpm/µg (Dunkel-Keimlinge) ergibt, daß die Transkriptionsrate der Poly(A)-RNS in Licht-Keimlingen um annähernd 30 % höher ist als in Dunkel-Keimlingen.
Dieses Ergebnis stimmt mit den Erwartungen überein im Hinblick auf die erhöhte physiologische Aktivität, die bei höheren Pflanzen spezifisch durch das Wachstum im Licht auftritt, im Gegensatz zu einem im Vergleich dazu reduzierten Metabolismus unter Dunkelbedingungen.
Ähnliche Verhältnisse wurden in Blättern von Phaseolus aureus gefunden, in denen bei der Zellteilung zwischen dem 2. und 5. Tag im Licht ein 5-facher Anstieg des Polyadenylsäure-Gehalts gegenüber den Dunkel-Kulturen beobachtet wurde (Grierson und Covey, 1975).

In der hier gezeigten Poly(A)-RNS-Population der Licht-Keimlinge (Abb. 4a) kann eine Verunreinigung durch ribosomale RNS-Komponenten beobachtet werden. Normalerweise tritt dieses Phänomen erst bei längeren radioaktiven Markierungszeiten auf, so daß die spezifische Radioaktivität der ribosomalen RNS die der schnell markierten mRNS erreicht.
Dagegen haben bei einer relativ kurzen radioaktiven Markierungs-

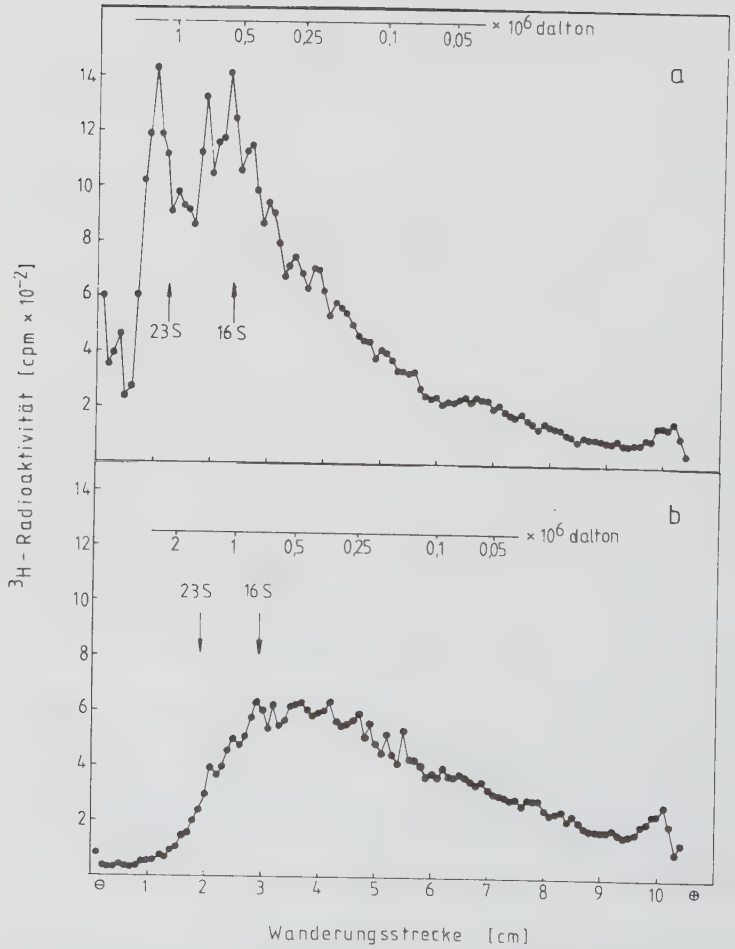


Abb. 4: Gelelektrophorese von Poly(A)-RNS aus M.incana-Keimlingen, in-vivo radioaktiv markiert mit 100 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin für 4 Std. am 2. Keimungstag, auf 4 % Formamid-Polyacrylamid. Elektrophorese von jeweils 20 µg Poly(A)-RNS aus a) Licht-Keimlingen und b) Dunkel-Keimlingen.

zeit, wie sie in diesem Experiment angewandt wurde, vorwiegend nur die schnell-markierten RNS-Arten, wie die Poly(A)-RNS, eine hohe spezifische Radioaktivität und sind damit meßbar, während die ribosomale RNS, auch wenn sie als Verunreinigung in der Präparation vorhanden ist, nocht nicht meßbar sein sollte. Obwohl das Ausmaß der Verunreinigung 5-10 % nicht übersteigt, ist sie in den Hybridisierungsexperimenten ein wesentlicher Störfaktor, wie in Kapitel 3.4.1 ausführlich dargestellt wird.

3.4 Sättigungshybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS

Der Prozentsatz der DNS, der komplementär zu den mRNS-Populationen aus den verschiedenen Entwicklungsstadien ist, wurde durch Sättigungshybridisierung von DNS und der jeweiligen Poly(A)-RNS mit der Methode der Filtertechnik bestimmt(Gillespie und Spiegelman, 1965; Grierson und Hemleben, 1977). Diese Methode wurde zunächst deshalb gewählt, um durch die Immobilisierung der DNS eine Reassoziation der DNS-Moleküle untereinander zu verhindern, indem die zuvor denaturierte DNS auf Nitrocellulose-Filtern fixiert wird. Ein weiterer Vorteil der Hybridisierung mit immobilisierter DNS liegt darin, daß DNS-RNS-Hybridmoleküle durch die Fixierung am Membranfilter im Gegensatz zu einer Hybridisierung in Lösung im weiteren Verlauf der Hybridisierungsreaktion nicht mehr dissoziieren (Gillespie und Spiegelman, 1965).

Zunächst wurden Sättigungshybridisierungsversuche von Filtergebundener DNS und der Poly(A)-RNS aus Licht-Keimlingen und Dunkel-Keimlingen von M.incana durchgeführt, die in-vivo mit 200 µCi/ml ^{3}H-Uridin für 24 Stunden vom 3.-4. Keimungstag radioaktiv markiert worden waren.

Da für diese Experimente eine Poly(A)-RNS von hoher spezifischer Radioaktivität erforderlich war, wurde eine radioaktive Markierungsdauer von 24 Stunden gewählt, um "steady state"-Markierungsbedingungen zu erzielen.
Unter diesen Bedingungen sollte der größte Teil der in der Poly(A)-RNS gemessenen Radioaktivität in der cytoplasmatischen mRNS akkumuliert sein, während nur ein geringer Teil in der nuklearen heterogenen RNS (hnRNS) vorhanden sein sollte, die einem sehr raschen Processing unterliegt.
Wie bereits in Kapitel 3.3 erwähnt wurde, war es nicht möglich, unter diesen radioaktiven Markierungsbedingungen eine Poly(A)-RNS zu isolieren, die völlig frei von meßbaren Verunreinigungen durch ribosomale RNS-Komponenten ist, da bei so langen Markierungszeiten die spezifische Radioaktivität der ribosomalen RNS die der schnell markierten Poly(A)-RNS erreicht.

Erste Hybridisierungsversuche mit Filter-gebundener DNS und der auf die genannte Weise radioaktiv markierten Poly(A)-RNS zeigten eine relativ hohe und schnelle Anfangshybridisierung, gefolgt von einer zweiten, langsamer hybridisierenden Komponente. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß mindestens zwei kinetische Komponenten an der Hybridisierungsreaktion beteiligt waren, und daß die für die schnelle Anfangshybridisierung verantwortliche Komponente auf eine ribosomale Kontamination zurückzuführen ist.

3.4.1 Sättigungshybridisierung von einzelnen DNS-Fraktionen eines Actinomycin-Cäsiumchlorid-Gradienten und Poly(A)-RNS

In welchem Ausmaß ribosomale RNS-Sequenzen die Hybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS beeinflussen können, zeigt das in Abbildung 5 dargestellte Experiment.
Die DNS wurde dazu in einem Actinomycin-Cäsiumchlorid-Gradienten zentrifugiert, um die ribosomalen DNS-Sequenzen von den DNS-Sequenzen der Hauptbande abzutrennen (Hemleben et al., 1977). Die einzelnen DNS-Fraktionen des Gradienten wurden denaturiert, auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und die Filter halbiert. Der eine Satz von Halbfiltern wurde direkt in der Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS eingesetzt. Das in Abbildung 5, Kurve a, dargestellte Ergebnis zeigt zwei Hybridisierungspeaks, von denen ein Peak mit der Hauptbanden-DNS übereinstimmt, während der andere auf der "leichten" Seite der Hauptbande im Bereich der ribosomalen DNS-Sequenzen lokalisiert ist. Dies zeigt eindeutig die Anwesenheit von ribosomalen RNS-Molekülen im Hybridisierungsansatz.
Ist die Verunreinigung der Poly(A)-RNS durch ribosomale RNS auch nicht höher als 5-10 % (vgl. Kapitel 3.3; Abb. 4a), ist mit diesem Ergebnis jedoch eindeutig erwiesen, daß sie dennoch zu beträchtlichen Hybridisierungswerten führt, obwohl ihr Anteil am Hybridisierungsgemisch nicht ausreichend sein dürfte, um alle ribosomalen Gene abzusättigen.

Der zweite Satz von Halbfiltern wurde zuerst mit unmarkierter ribosomaler 25S und 18S RNS in hohem Exzess bis zum Sättigungswert inkubiert, der in 2 x SSC bei 70 ^{o}C nach 3 Stunden erreicht ist (Grierson und Hemleben, 1977), und anschließend mit der Poly(A)-RNS in 6 x SSC + 0,1 % SDS bei 75 ^{o}C für 72 Stunden hybridisiert. Eine Hybridisierung ist unter diesen Bedingungen nur noch mit Sequenzen der Hauptbanden-DNS zu beobachten (Abb. 5, Kurve b).

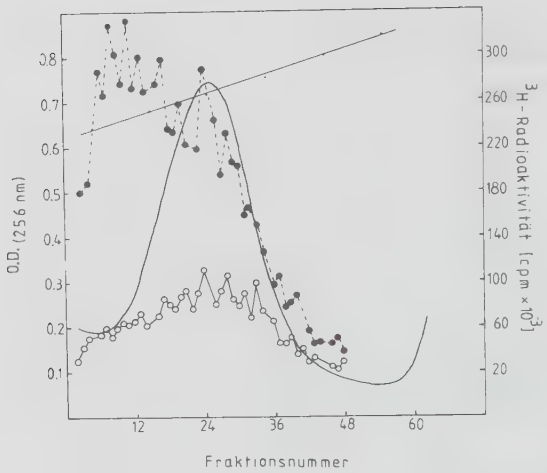


Abb. 5: Hybridisierung von ^{3}H-Uridin-markierter Poly(A)-RNS mit DNS-Fraktionen eines Actinomycin-CsCl-Gradienten. mit und ohne Vorhybridisierung.
M.incana-DNS (300 µg) wurde in einem Actinomycin·D-CsCl-Gradienten zentrifugiert, die DNS-Fraktionen denaturiert, auf Nitrocellulose-Filtern fixiert und in zwei Hälften geschnitten. Der eine Satz von Halbfiltern wurde a) direkt mit Poly(A)-RNS (spez. Radioakt. 52.000 cpm/µg; 8 µg/ml) in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 72 Std. bei 65 °C hybridisiert (●----●); b) der andere Satz von Halbfiltern wurde zunächst mit unmarkierter 25S und 18S rRNS (150 µg/ml) in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65 °C inkubiert; die Filter wurden anschließend gewaschen und mit Poly(A)-RNS (spez. Radioakt. 52.000 cpm/µg; 8 µg/ml) in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 72 Std. bei 65 °C hybridisiert (o——o). Nach der Hybridisierung wurden die Filter gewaschen, RNase-behandelt, und die Radioaktivität gemessen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß eine solche Vorhybridisierung der Filter-gebundenen DNS mit ribosomaler RNS in einer Absättigung der ribosomalen Gene resultiert, so daß diese in der nachfolgenden Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS keine Hybridbindung mehr eingehen können.

3.4.2 Sättigungshybridisierung von vorhybridisierter DNS und Poly(A)-RNS

Aufgrund der in Kapitel 3.4.1 dargestellten Ergebnisse wurden alle folgenden Sättigungshybridisierungsversuche erst nach einer solchen Vorhybridisierung der DNS-Filter durchgeführt. Dazu wurden jedoch nicht nur, wie im vorherigen Experiment, die 25S und 18S rRNS benutzt, sondern die gesamte $Poly(A)^+$-RNS, wie sie durch die Affinitätschromatographie isoliert wird, und die neben der rRNS und 5S RNS auch die tRNS sowie die nicht polyadenylierte mRNS enthält. Diese Vorhybridisierung der DNS (mit 50 µg/ml $Poly(A)^+$-RNS in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Stunden bei 65 ^{o}C) sollte gewährleisten, daß alle DNS-Sequenzen vorwiegend repetitiver Natur weitgehend abgesättigt sind.

Abbildung 6 zeigt die Sättigungshybridisierung von vorhybridisierter DNS und der Poly(A)-RNS aus Licht-Keimlingen (Abb. 6a) und Dunkel-Keimlingen (Abb. 6b) von M.incana, die mit 200 µCi/ml ^{3}H-Uridin für 24 Stunden vom 3.-4. Keimungstag radioaktiv markiert worden waren. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über insgesamt 120 Stunden in 6 x SSC + 0,1 % SDS bei 68 ^{o}C.
Die pro Zeitwert erhaltenen Meßdaten wurden gemittelt und in einer Regressionsanalyse eingesetzt. Die durchgezogenen Linien in Abbildung 6 zeigen den Regressions-best-fit für eine Ein-

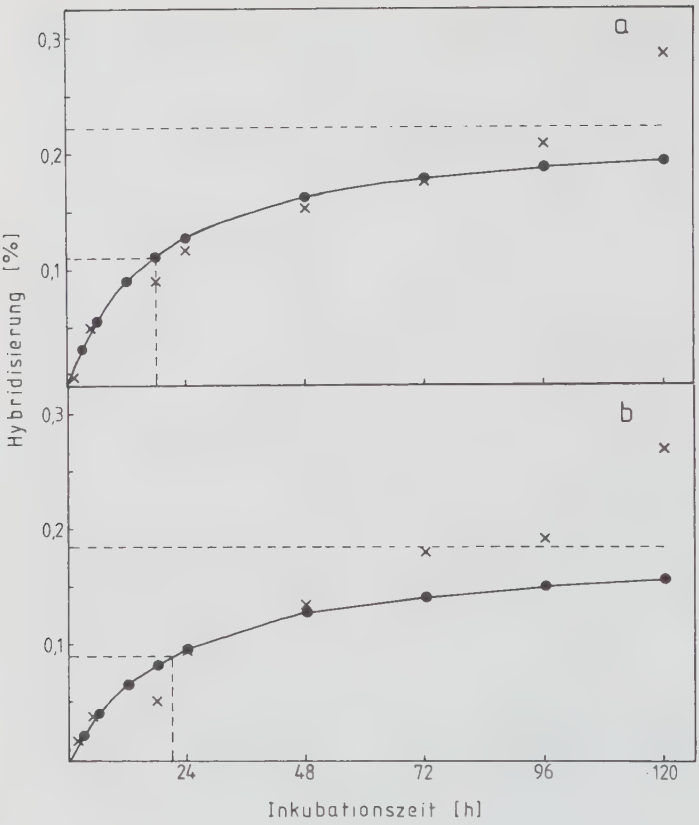


Abb. 6: Sättigungshybridisierung von Filter-gebundener DNS und ^{3}H-Poly(A)-RNS aus Licht- und Dunkel-Keimlingen von M.incana, in vivo radioaktiv markiert mit 200 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin für 24 Std. vom 2.-3. Keimungstag, nach Vorhybridisierung der DNS-Filter.
Die über einem CsCl-Gradienten gereinigte DNS wurde auf Nitrocellulose-Filtern fixiert (20 µg/Filter) und mit unmarkierter Poly(A)$^{-}$-RNS (50 µg/ml) in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65 ^{o}C vorhybridisiert, gewaschen und anschließend mit je 15 µg/ml ^{3}H-Poly(A)-RNS aus a)Licht-Keimlingen (spez. Radioakt. 2.800 cpm/µg) oder aus b) Dunkel-Keimlingen (spez. Radioakt. 2.450 cpm/µg) für die angegebenen Zeiten hybridisiert. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden die Filter RNase-behandelt, gewaschen, die Radioaktivität gemessen und der DNS-Gehalt der Filter bestimmt. Die durchgezogenen Kurven (●——●) zeigen den Regressions-best-fit der gemittelten Hybridisierungswerte (x) für eine Ein-Komponenten-Reaktion.

Komponenten-Reaktion.
Bei der Hybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS aus Licht-Keimlingen (Abb. 6a) ergibt die Regression einen Sättigungswert der Hybridisierung von 0,22 % mit einer Halbwertszeit, zu der 50 % Hybridisierung stattgefunden haben, von 18 Stunden.
Bei der Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS aus Dunkel-Keimlingen (Abb. 6b) wird ein Sättigungswert von 0,18 % mit einer Halbwertszeit von 21 Stunden berechnet.
Betrachtet man die einzelnen Meßwerte, die man bei den langen Inkubationszeiten erhält (96-120 Stunden), so ist zu erkennen, daß sie alle oberhalb des in der Regressionsanalyse berechneten Sättigungswertes liegen. Dies legt die Vermutung nahe, daß an der Hybridisierungsreaktion mehr als nur eine kinetische Komponente beteiligt ist. Der "Exakte Test auf Linearität der Regressionsfunktion" ergab jedoch keine signifikante Abweichung von einer Ein-Komponenten-Reaktion.
Denkbar wäre die Möglichkeit, daß die Poly(A)-RNS neben der cytoplasmatischen mRNS auch einen Anteil von nuklearer mRNS enthält, da die Poly(A)-RNS aus der gesamten zellulären RNS isoliert wurde.

3.4.3 Sättigungshybridisierung von vorhybridisierter DNS und nuklearer Poly(A)-RNS

Für die heterogene nukleare RNS (hnRNS) tierischer Zellen wurde gezeigt, daß sie intervenierende Sequenzen teilweise auch repetitiven Ursprungs besitzt (Darnell, 1979), und daher möglicherweise die Funktion eines Precursors der cytoplasmatischen mRNS hat (Ryskov et al., 1976; Kramerov et al., 1977). Wäre der repetitive Charakter der intervenierenden Sequenzen auch bei pflanzlicher hnRNS der Fall, dann könnte sie aufgrund dieser Eigenschaft die schnell reagierende Komponente des in

Kapitel 3.4.2 beschriebenen Hybridisierungsversuchs darstellen, während die cytoplasmatische mRNS, deren intervenierende Sequenzen durch das Processing herausgeschnitten wurden, und die daher nur Single-copy-Sequenzen besitzt (Ryskov et al., 1976), die langsamer hybridisierende Komponente darstellen würde.

Ungeachtet dieser möglichen Erklärung des in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisses sollten bei einer Hybridisierung von DNS und nuklearer Poly(A)-RNS Sättigungswerte erreicht werden, die weit höher liegen als bei der Hybridisierung mit der gesamten zellulären mRNS, da die nukleare Poly(A)-RNS durch die Anwesenheit der intervenierenden Sequenzen eine größere Komplexität hat als die cytoplasmatische mRNS.
Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Sättigungshybridisierung von Filter-gebundener, vorhybridisierter DNS und der Poly(A)-RNS aus isolierten Zellkernen von M.incana-Keimlingen durchgeführt. Als Beispiel ist in Abbildung 7 die Hybridisierung mit der nuklearen Poly(A)-RNS aus Licht-Keimlingen (radioaktive Markierung in-vivo mit jeweils 100 µCi/ml ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Adenin vom Keimungsbeginn an für insgesamt 4 Tage) dargestellt. Da die RNS in diesem Experiment zusätzlich mit ^{3}H-Adenin radioaktiv markiert worden war, wurde die RNase-Behandlung nach der Hybridisierungsreaktion sowohl mit RNase A als auch mit RNase T_1 durchgeführt, so daß dadurch auch nicht hybridisierte ^{3}H-Polyadenylsäure-Reste abgebaut werden.

Die Regressionsanalyse der Hybridisierungsdaten (Abb. 7, durchgezogene Kurve) ergibt einen Sättigungswert von 1,08 % bei einer Halbwertszeit von 24 Stunden. Dieser Sättigungswert ist im Vergleich zu dem von 0,22 % für die gesamte zelluläre Poly(A)-RNS der Licht-Keimlinge (Abb. 6a) um etwa den Faktor 5 größer. Unter der Annahme, daß die gesamte zelluläre Poly(A)-RNS vorwiegend aus cytoplasmatischer mRNS besteht, würde aus diesen Daten folgen, daß nur etwa 20 % der nuklearen Poly(A)-RNS in der cytoplasmatischen mRNS repräsentiert sind. Ähnliche Verhält-

nisse liegen in den Blättern von Tabakpflanzen vor, wo nur etwa 28 % der nuklearen RNS-Sequenzen in der Polysomen-mRNS vorhanden sind (Goldberg et al., 1978).

Die Vermutung, daß die intervenierenden Sequenzen der hnRNS möglicherweise repetitiven Ursprungs sind, kann mit diesem Experiment nicht entschieden werden. Die gefundene Halbwertszeit der Hybridisierungsreaktion von 24 Stunden entspricht jener, die auch bei der Sättigungshybridisierung mit der Poly(A)-RNS aus den Licht-Keimlingen berechnet wird (vgl. Abb. 6a und Kapitel 3.4.2).
So läßt der höhere Sättigungswert bei gleicher Halbwertszeit lediglich den Schluß zu, daß die Poly(A)-RNS aus den Zellkernen von M.incana eine höhere Komplexität hat als die cytoplasmatische mRNS. Nachgewiesen ist dies bereits für die Kern-RNS aus Nicotiana tabacum, die annähernd 4-mal komplexer ist als die polysomale mRNS (Goldberg el al., 1978).

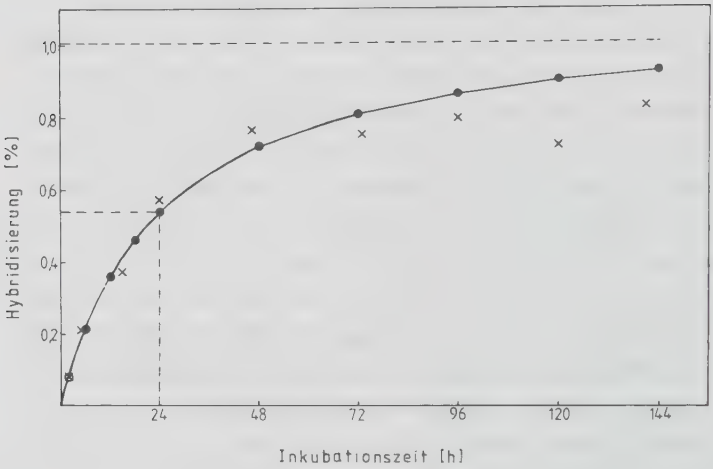


Abb. 7: Sättigungshybridisierung von Filter-gebundener DNS und nuklearer ^{3}H-Poly(A)-RNS aus M.incana-Keimlingen, in vivo radioaktiv markiert mit je 100 µCi/ml (5'-^{3}H)-Uridin und (8'-^{3}H)-Adenin vom Keimungsbeginn an für 4 Tage, nach Vorhybridisierung der DNS-Filter.
Nach der Vorhybridisierung mit unmarkierter Poly(A)$^{-}$-RNS (50 µg/ml in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65 °C) erfolgte die Hybridisierung mit 10 µg/ml ^{3}H-Poly(A)-RNS aus Zellkernen (spez. Radioakt. 25.500 cpm/µg) in 6 x SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C für die angegebenen Zeiten. Nach der Hybridisierung wurden die Filter gewaschen, mit RNase A und T_1 für 30 min inkubiert, nochmals gewaschen, die Radioaktivität gemessen und der DNS-Gehalt der Filter bestimmt. Die durchgezogene Kurve (●——●) zeigt den Regressions-best-fit der gemittelten Meßwerte (x) für eine Ein-Komponenten-Reaktion.

3.4.4 Sättigungshybridisierung von vorhybridisierter DNS und Poly(A)-RNS aus Blüten von M.incana

Eine Sättigungshybridisierung von DNS wurde auch mit der Poly(A)-RNS aus Blütenblättern von M.incana, Stamm 04, durchgeführt. Die Blüten wurden als Ausgangsmaterial verwendet, da sie im Vergleich zu Keimlingen ein differenziertes Gewebe darstellen, das möglicherweise eine spezifische mRNS-Population synthetisiert.

Die Blüten befanden sich zur Zeit der Ernte im Knospenstadium, in dem die Anthocyan-Biosynthese bereits sichtbar begonnen, die Kelchblätter sich aber noch nicht oder nur teilweise geöffnet hatten (Abb. 8). Dieses Entwicklungsstadium der Blüten wurde in

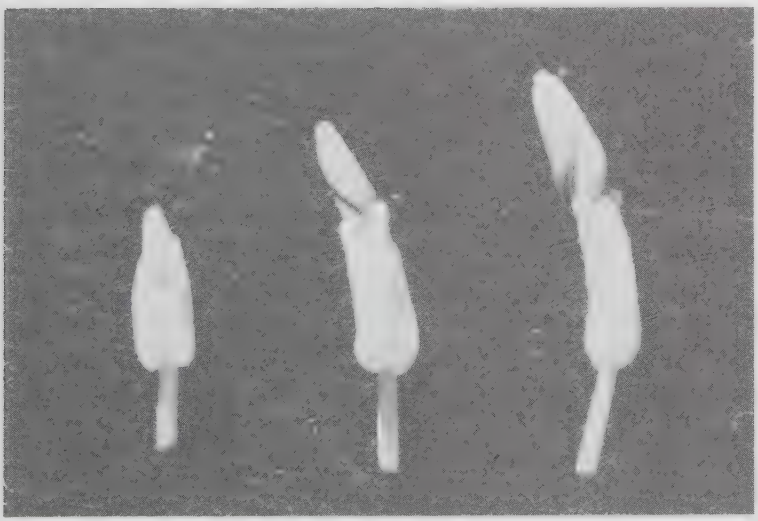


Abb. 8: Blütenstadien 1, 2 und 3 von M.incana

der Annahme gewählt, daß sich die Gene für die mRNS der Flavonoid-Biosynthese hier im aktiven Zustand der Transkription befinden, und daß damit zu diesem Zeitpunkt eine Anreicherung dieser spezifischen Gentranskripte möglich sein sollte.

Für diese Versuche wurde die Poly(A)-RNS zunächst aus den Blüten isoliert und anschließend in-vitro mit ^{125}Jod radioaktiv markiert. Die Methode der Jodierung, die auf der Substitution eines Wasserstoffatoms im Cytosin durch das ^{125}Jod-Atom beruht, garantiert eine Markierung der RNS-Moleküle zu einer hohen spezifischen Radioaktivität, die Werte im Bereich von 10^5-10^6 cpm/µg erreicht.
Die ^{125}Jod-Poly(A)-RNS wurde dann in der Sättigungshybridisierung mit Filter-gebundener, vorhybridisierter DNS unter Zugabe von 25 % Formamid eingesetzt. Durch die denaturierende Wirkung des Formamid wird eine Rückfaltung der mRNS-Moleküle verhindert.

In Abbildung 9, die eine Sättigungshybridisierung von DNS und der Poly(A)-RNS aus den Blüten von M.incana, Stamm 04, darstellt, ist zu erkennen, daß das Sättigungsplateau unter diesen Reaktionsbedingungen bereits nach 48 Stunden erreicht wird, und die Reaktion nach 72-96 Stunden annähernd in den Sättigungsbereich der Hybridisierung übergeht.
Die Regressionsanalyse der Hybridisierungsdaten ergibt einen Sättigungswert von 0,26 %, und eine Halbwertszeit von 1,5 Stunden. Diese niedrige Halbwertszeit, die auf eine sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit hindeutet, könnte trotz der Vorhybridisierung der DNS-Filter mit unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS auf eine ribosomale Verunreinigung zurückzuführen sein. Andererseits könnten, wie oben bereits erwähnt, in der Poly(A)-RNS neben der cytoplasmatischen mRNS auch polyadenylierte mRNS-Vorstufen aus dem Zellkern vorhanden sein, die die Hybridisierungsreaktion in der oben erwähnten Weise beeinflussen. Wäre dies der Fall, dann würde aufgrund der sehr niedrigen Halbwertszeit die nukleare RNS an der mRNS-Population der Blüten allerdings einen relativ

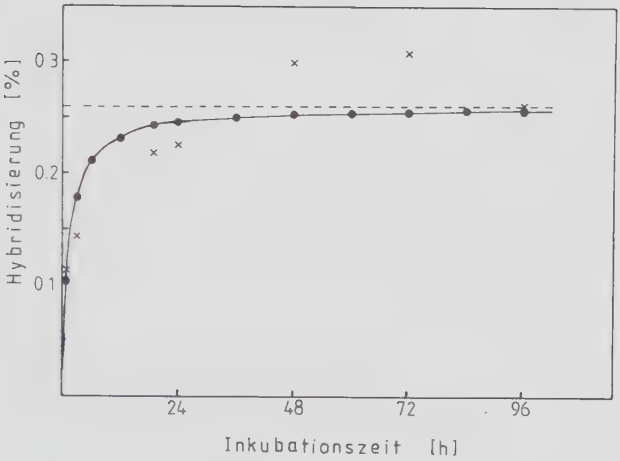


Abb. 9: Sättigungshybridisierung von Filter-gebundener DNS und ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus Blüten von M.incana, Stamm 04, nach Vorhybridisierung der DNS-Filter.
Nach der Vorhybridisierung der DNS-Filter mit unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS (50 µg/ml in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65 °C) erfolgte die Hybridisierung mit 15 µg/ml der in vitro mit ^{125}Jod radioaktiv markierten Poly(A)-RNS aus den Blüten (spez. Radioakt. 8 x 10^5 cpm/µg) in 6 x SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C für die angegebenen Zeiten. Nach der Hybridisierung wurden die Filter mit RNase behandelt, in 2 x SSC gewaschen, die Radioaktivität gemessen und der DNS-Gehalt der Filter bestimmt. Die durchgezogene Kurve (●——●) zeigt den Regressions-best-fit der gemittelten Meßwerte (x) für eine Ein-Komponenten-Reaktion.

hohen Anteil repräsentieren, im Vergleich zu den Versuchen mit der Poly(A)-RNS aus den Keimlingen von M.incana mit ihren weitaus höheren Halbwertszeiten von 18 Stunden bzw. 24 Stunden. Eine weitere und die wahrscheinlichste Möglichkeit einer Interpretation besteht darin, daß in den Blüten im Vergleich zu den Keimlingen eine oder mehrere Klassen der mRNS-Population in relativ hoher Abundanz vorkommen, d.h., daß von einem Single-copy-Gen nicht nur eine, sondern mehrere bis viele Kopien pro Zelle vorliegen.

3.4.5 Genzahl-Schätzungen

Die durch die Regressionsanalyse berechneten Sättigungswerte der einzelnen Hybridisierungsreaktionen wurden für die Berechnung der in dem spezifischen untersuchten Entwicklungsstadium aktiv transkribierten Gene benutzt.

Ausgehend vom DNS-Gehalt von M.incana von 1,5 pg pro haploidem Genom (Grierson und Hemleben, 1977), und von der Länge eines Unique-Gens von durchschnittlich 1.050 Nukleotiden (die Längenangabe bezieht sich nur auf die codierende Sequenz des Unique-Gens ohne den Anteil an intervenierenden Sequenzen, der bei M.incana etwa 300-400 Nukleotide beträgt; Wenzel, 1977), sowie unter der Annahme asymmetrischer Transkription errechnet sich aus dem Sättigungswert von 0,22 % bei der Hybridisierung der DNS und Poly(A)-RNS aus Licht-Keimlingen (Abb. 6a) eine Anzahl von annähernd 5.800 aktiv transkribierten Genen pro haploidem Genom. Bei Dunkel-Keimlingen wird eine Zahl von etwa 4.700 aktiven Genen berechnet, entsprechend 0,18 % DNS, die mit der Poly(A)-RNS aus den Dunkel-Keimlingen hybridisieren (Abb. 6b). Aus dem Sättigungswert von 0,26 % bei der Hybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS aus den Blüten von M.incana (Abb. 9) wird

eine Zahl von etwa 6.800 aktiv transkribierten Gene pro haploidem Genom berechnet.
Der bei der Hybridisierung von DNS und Poly(A)-RNS aus Zellkernen gefundene Sättigungswert von 1,08 % (Abb. 7) würde nach diesen Berechnungen einer Anzahl von etwa 28.000 aktiv transkribierter Gene entsprechen. Da jedoch die Poly(A)-RNS aus den Zellkernen eine höhere Sequenzkomplexität hat und um etwa den Faktor 5 größer ist als die cytoplasmatische mRNS (vgl. Kapitel 3.4.3), würde sich die Anzahl der transkribierten Gene um diesen Faktor reduzieren.
Bei dieser Genzahl-Schätzung wurde die Fraktion der mRNS, die keine Poly(A)-Sequenz an ihrem 3'-Ende trägt, nicht berücksichtigt. Nach einer Schätzung von Grierson und Covey (1976) soll der Anteil der nicht polyadenylierten mRNS an der gesamten zellulären mRNS etwa 40 % betragen. Demnach würde sich entsprechend dieses Anteils auch die Anzahl der transkribierten Gene um 40 % erhöhen. Diese Annahme würde jedoch nur unter der Voraussetzung gelten, daß die nicht polyadenylierte mRNS informative Sequenzen enthält, die von denen der Poly(A)-RNS verschieden sind. Die Ergebnisse neuer Renaturierungsuntersuchungen von ^{3}H-cDNS (aus Poly(A)-RNS von Licht-Keimlingen mit AMV-Reverse Transkriptase) mit Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^{-}$-RNS aus Licht-Keimlingen zeigen jedoch, daß der Anteil der nicht polyadenylierten mRNS an der gesamten zellulären mRNS etwa 67 % beträgt, und daß die nicht polyadenylierte mRNS zum großen Teil gleiche informative Sequenzen enthält wie die Poly(A)-RNS (Wenzel, 1980).

Überträgt man den Prozentsatz der DNS, der mit der Poly(A)-RNS hybridisiert, auf den Anteil der Unique-Sequenzen, der bei M.incana etwa 31 % des Genoms darstellt (Wenzel, 1980), so entsprechen 0,22 % DNS (Licht-Keimlinge) einem Wert von annähernd 0,73 % einzelsträngiger Unique-DNS bzw. 1,46 % doppelsträngiger Unique-DNS; 0,18 % DNS (Dunkel-Keimlinge) resultieren in etwa 0,6 % einzelsträngiger Unique-DNS bzw. 1,2 % doppel-

Tabelle I: Sättigungshybridisierung und Genzahl-Schätzung

Sättigungshybridisierung von DNS und	Sättigungswert bezogen auf Gesamt-DNS (ES)[1]	Halbwertszeit	% Hybridisierung bezogen auf die Unique-DNS		Genzahl-Schätzung bezogen auf die Poly(A)-RNS
			ES	DS[2]	
Poly(A)-RNS Licht-Keimlinge	0,22 %	18,0 h	0,73 %	1,46 %	5.800
Poly(A)-RNS Dunkel-Keimlinge	0,18 %	21,0 h	0,60 %	1,20 %	4.700
Poly(A)-RNS Blütenblätter	0,26 %	1,5 h	0,86 %	1,72 %	6.800
Poly(A)-RNS aus Zellkernen von Licht-Keimlingen	1,08 %	24,0 h	3,56 %	7,12 %	

1) ES = Einzelstrang
2) DS = Doppelstrang

strängiger Unique-DNS; die Hybridisierung von 0,26 % DNS in den Blüten führt zu einem Wert von 0,86 % Einzelstrang- bzw. etwa 1,72 % Doppelstrang-Unique-DNS. Aus dem Hybridisierungswert von 1,08 % mit der Poly(A)-RNS aus den Zellkernen errechnet sich ein Wert von 3,56 % transkribierter Unique-DNS (Einzelstrang) bzw. von 7,12 % Unique-DNS (Doppelstrang). Diese hier aufgeführten Daten sind in Tabelle I zusammengefaßt.

3.5 Hybridisierung von Restriktionsfragmenten der DNS und Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^-$-RNS

Diesen Versuchen liegt folgende Überlegung zugrunde: Durch einen enzymatischen Abbau der DNS mit Restriktionsendonukleasen und der elektrophoretischen Auftrennung der erhaltenen DNS-Fragmente mit der Methode von Southern (1975) sollte es möglich sein, durch Hybridisierung eines oder mehrere DNS-Fragmente zu identifizieren, die komplementär zu einer spezifischen mRNS sind, d.h. Fragmente, in denen die codierenden Sequenzen für eine definierte mRNS enthalten sind. Diese Überlegung gründet auch auf dem Ergebnis der Sättigungshybridisierung von DNS und der Poly(A)-RNS aus den Blüten des M.incana-Stammes 04 mit der Filtertechnik (vgl. Kapitel 3.4.4 und Abb. 9), bei dem aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Hybridisierungsreaktion auf das Vorhandensein einer oder mehrerer abundanter mRNS-Klassen geschlossen wurde.
Um neben einer Blüten-spezifischen eventuell auch eine Stamm-spezifische mRNS erkennen zu können, wurde zur Hybridisierung mit den Restriktionsfragmenten die mRNS aus verschiedenen M.incana-Stämmen und unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht. Im einzelnen wurde die Poly(A)-RNS folgender M.incana-Stämme getestet:

Poly(A)-RNS aus Keimlingen vom Stamm 17
Poly(A)-RNS aus Blüten vom Stamm 17
Poly(A)-RNS aus Blüten vom Stamm 04

Bei der Wahl der Stämme wurde einmal davon ausgegangen, daß sich eventuell Unterschiede zwischen Keimlingen und den im Vergleich dazu spezialisierten Blüten des gleichen Stammes zeigen könnten. Zum anderen könnten zwischen den mRNS-Populationen verschiedener Stämme Unterschiede aufgrund der Tatsache auftreten, daß sich die einzelnen Stämme sowohl genotypisch als auch phänotypisch durch eine unterschiedliche Quantität und Qualität des Anthocyanmusters unterscheiden.
Die Voraussetzung für das Auftreten von Anthocyanpigmenten ist ein polygen gesteuerter, intakter Flavonoid-Biosyntheseweg (Abb. 12). Dieser ist bei den Pflanzen vom Stamm 17 durch die Existenz rezessiver Allele im e-Locus unterbrochen (Tabelle III) und resultiert in der Ausbildung gelblich-weißer Blüten. Dagegen gehört der Stamm 04 zum Anthocyan-synthetisierenden Genotyp, dessen Blüten eine leuchtend lila Pigmentierung zeigen (Tabelle III).

Für die Hybridisierungsversuche wurde zunächst die DNS mit Restriktionsenzymen (Eco R I und Bst I) jeweils in einem Einzelabbau abgebaut, die DNS-Fragmente auf einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit der Southern-Technik auf Nitrocellulose-Filterstreifen fixiert (vgl. Kapitel 2.9). Hybridisiert wurde mit den verschiedenen, mit ^{125}Jod in-vitro radioaktiv markierten Poly(A)-RNS-Populationen (vgl. Kapitel 2.7) und mit ^{125}Jod-Poly(A)$^-$-RNS im Kontrollexperiment.
Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Sättigungshybridisierungsversuchen (Kapitel 3.4) wurde ein Teil der Versuche erst nach einer entsprechenden Vorhybridisierung der Filterstreifen mit unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS (2,5 µg/ml bei 65 ^{o}C für 3 Stunden) durchgeführt. Dieser Vorhybridisierung wurden jene Filterstreifen unterzogen, die anschließend mit der Poly(A)-RNS

aus Keimlingen von M.incana, Stamm 17 (Anzucht 4 Tage unter Dauerlicht) und aus den Blüten von M.incana, Stamm 17, hybridisiert wurden. Die anderen Filterstreifen wurden direkt in die Hybridisierungsreaktion mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten von M.incana, Stamm 04, oder mit der Poly(A)$^-$-RNS im Kontrollexperiment eingesetzt (jeweils 0,4 µg RNS pro Filterstreifen für 24 Stunden bei 65 ^oC), und anschließend autoradiographiert.

3.5.1 Hybridisierung von Bst I-Restriktionsfragmenten und Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^-$-RNS

Die Ergebnisse der Hybridisierung von nicht vorhybridisierten Bst I-Fragmenten und der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04 (Abb.10, b) zeigen bei einem Vergleich mit dem Ergebnis des Kontrollexperiments (Abb. 10, a), daß sowohl die Poly(A)$^-$-RNS als auch die Poly(A)-RNS der Blüten vom Stamm 04 mit einer ganzen Reihe von Bst I-Fragmenten in gleicher Weise hybridisiert. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Poly(A)-RNS der Blüten vom Stamm 04 einen hohen Anteil an RNS-Sequenzen enthält, die keinen Messenger-Charakter haben, sondern den Komponenten der Poly(A)$^-$-RNS zuzuordnen sind, d.h. rRNS und tRNS enthält. Vergleicht man die mit Poly(A)$^-$-RNS hybridisierenden Bst I-Fragmente mit jenen, die mit reiner ribosomaler 25S und 18S RNS hybridisieren (Friedrich et al., 1979), so erkennt man, daß nur ein Teil der Fragmente reine ribosomale Gene enthalten. Abgesehen von den zwei großen Fragmenten vom Molekulargewicht 6,74 x 10^6 Dalton und 5,61 x 10^6 Dalton, die nach den Ergebnissen von Friedrich et al. (1979) unvollständig abgebaute ribosomale DNS-Sequenzen darstellen, treten einige Fragmente auf, die keine hybridisierbaren ribosomalen Sequenzen enthalten. Beispiele dafür sind die Fragmente vom Molekulargewicht 4,45 x 10^6 Dalton und 1,85 x 10^6 Dalton, die das Vorhandensein von Gensequenzen für die tRNS oder für die nicht polyadenylierte mRNS vermuten lassen.

Betrachtet man nun das Ergebnis der Hybridisierung von vorhybridisierten Bst I-Fragmenten und der Poly(A)-RNS aus Keimlingen vom Stamm 17 und aus Blüten vom Stamm 17 (Abb. 10, c und d), so erfolgt keine Hybridisierung mit jenen Fragmenten, die im Kontrollexperiment mit Poly(A)$^-$-RNS beobachtet werden. Offensichtlich hat die Vorhybridisierung dazu geführt, daß sämtliche für die Komponenten der Poly(A)$^-$-RNS codierenden Sequenzen abgesättigt sind, und eine Hybridisierung nur noch mit solchen Fragmenten stattfindet, die ausschließlich spezifische, für die Poly(A)-RNS codierende Sequenzen enthalten. Weiter kann daraus geschlossen werden, daß die Bst I-Fragmente, die nach der Vorhybridisierung keine Hybridisierung mehr zeigen, ausschließlich Gen-Sequenzen für die Komponenten der Poly(A)$^-$-RNS enthalten.

Vergleicht man nun die für die Poly(A)-RNS spezifischen Hybridisierungsbanden, so fallen zunächst zwei Fragmente auf, die nur mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04 hybridisieren. Das größere dieser beiden Fragmente hat ein Molekulargewicht von 2,6 x 10^6 Dalton, was einer Länge von 3.940 Basenpaaren entspricht; das Molekulargewicht des zweiten Fragments beträgt 0,68 x 10^6 Dalton entsprechend einer Länge von etwa 1.030 Basenpaaren (Abb. 10,b; Tabelle II). Dies scheint ein Hinweis dafür zu sein, daß in den Blüten von M.incana, Stamm 04, eine spezifische mRNS vorhanden ist, deren codierende DNS-Sequenzen in diesen Fragmenten lokalisiert sind.
Mit der Poly(A)-RNS aus den Keimlingen von M.incana, Stamm 17, und aus den Blüten vom Stamm 17 tritt eine Hybridisierung mit zwei Bst I-Fragmenten auf, die ein relativ kleines Molekulargewicht von 0,46 x 10^6 Dalton (≙ 700 Basenpaare) und kleiner als 0,4 x 10^6 Dalton (≙ kleiner als 600 Basenpaare) haben (Abb. 10, c und d; Tabelle II). Diese beiden kleinen Fragmente treten bei der Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04 nicht auf. Möglicherweise konnten in diesem Experiment die kleinen Restriktionsfragmente nicht aus dem Agarosegel heraus-

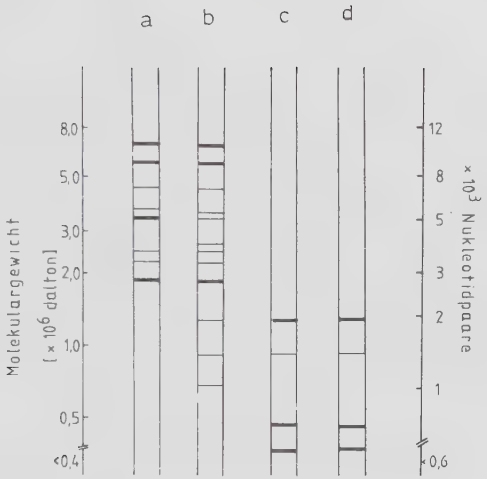


Abb. 10: Autoradiographie von Bst I-Restriktionsfragmenten der DNS nach Hybridisierung mit ^{125}Jod-Poly(A)$^-$-RNS und ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus Keimlingen und Blüten der M.incana-Stämme 04 und 17.
Jeweils 2 µg DNS wurden mit dem Restriktionsenzym Bst I abgebaut, die Fragmente in einem 1 % Agarosegel mit Hind III-abgebauter λ-DNS als Marker aufgetrennt, mit der Southern-Technik auf Nitrocellulose-Filterstreifen fixiert und in die Hybridisierungsreaktion mit jeweils 1 µg/ml der verschiedenen ^{125}Jod-RNS-Populationen in 6 x SSC + 25 % Formamid bei 60°C eingesetzt.
Hybridisierung mit
a) ^{125}Jod-Poly(A)$^-$-RNS (spez. Radioakt. 3,5 x 10^5 cpm/µg)
b) ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04 (spez. Radioakt. 7,7 x 10^5 cpm/µg)
c) ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 17 (spez. Radioakt. 6,5 x 10^5 cpm/µg) nach Vorhybridisierung der Bst I-Fragmente mit 2,5 µg/ml unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65 °C.
d) ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus Keimlingen vom Stamm 17 (spez. Radioakt. 3,5 x 10^5 cpm/µg) nach Vorhybridisierung der Bst I-Fragmente mit 2,5 µg/ml unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65°C.
Nach der Hybridisierung wurden die Filterstreifen in 2 x SSC gewaschen, mit RNase A behandelt, wieder gewaschen, getrocknet und auf "Kodirex"-Röntgenfilm für 2-4 Wochen exponiert. Die Banden vom Röntgenfilm wurden maßstabsgetreu aufgezeichnet.

eluiert werden, da die Elution der Fragmente und ihre Fixierung auf den Filterstreifen umso schwieriger wird, je kleiner das Molekulargewicht der Fragmente ist (Southern, 1975).
Zwei weitere Bst I-Fragmente sind zu erkennen, die mit allen untersuchten Poly(A)-RNS-Populationen hybridisieren (Abb. 10,b-d; Tabelle II). Das größere dieser beiden Fragmente hat ein Molekulargewicht von 1,23 x 10^6 Dalton entsprechend einer Länge von 1.870 Nukleotidpaaren und zeigt mit den mRNS-Populationen aus Keimlingen und Blüten vom Stamm 17 eine stärkere Hybridisierung als mit der mRNS aus den Blüten vom Stamm 04. Das zweite Fragment, das mit allen Poly(A)-RNS-Populationen in vergleichbarer Intensität hybridisiert, hat ein Molekulargewicht von 0,91 x 10^6 Dalton entsprechend einer Länge von 1.370 Nukleotidpaaren.

3.5.2 Hybridisierung von Eco R I-Restriktionsfragmenten und Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^-$-RNS

Bei der Auswertung der Autoradiographien der Hybridisierung von Eco R I-Fragmenten und den verschiedenen Poly(A)-RNS-Populationen kann zunächst ein Fragment identifiziert werden, das mit allen mRNS-Populationen hybridisiert, am stärksten jedoch mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten von M.incana, Stamm 04 (Abb. 11, b-d; Tabelle II). Das Molekulargewicht dieses Fragments beträgt 4,07 x 10^6 Dalton, was einer Länge von 6.170 Basenpaaren entspricht.
Zwei weitere Eco R I-Fragmente hybridisieren ebenfalls spezifisch mit der Poly(A)-RNS, wobei das eine Fragment mit einem Molekulargewicht von 0,92 x 10^6 Dalton ($\hat{=}$ 1.390 Basenpaare) nur mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 17 auftritt, während das zweite Fragment, dessen Molekulargewicht 0,77 x 10^6 Dalton ($\hat{=}$ 1.170 Basenpaare) beträgt, mit der Poly(A)-RNS sowohl der Keimlinge vom Stamm 17 als auch mit den Blüten vom Stamm 17

hybridisiert (Abb. 11, c und d; Tabelle II). Beide Fragmente zeigen keine Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten von M.incana, Stamm 04.

Im Gegensatz zu den Bst I-Fragmenten hybridisieren einige Eco R I-Fragmente sowohl mit der Poly(A)$^-$-RNS als auch mit den verschiedenen mRNS-Populationen. So sind drei Fragmente zu identifizieren, deren Molekulargewicht 3,24 x 10^6 Dalton (≙ 4.900 Basenpaare), 2,54 x 10^6 Dalton (≙ 3.850 Basenpaare) und 2,03 x 10^6 Dalton (≙ 3.080 Basenpaare) beträgt. Dieser Befund legt zunächst einmal die Vermutung nahe, daß in allen mRNS-Populationen ein hoher Anteil von kontaminierenden Komponenten der Poly(A)$^-$-RNS enthalten ist. Allerdings sollten, zumindest bei der Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS aus Keimlingen vom Stamm 17 und aus Blüten vom Stamm 17, diese Fragmente nicht mehr hybridisieren, da sie mit Poly(A)$^-$-RNS vorhybridisiert waren und demnach abgesättigt sein sollten.
Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses besteht darin, daß das Eco R I-Enzym aufgrund der statistischen Verteilung seiner Schnittstellen auf dem gesamten Genom zu Fragmenten von zwar gleichem Molekulargewicht, aber ganz unterschiedlichen Informationsgehalt führt.

Betrachtet man nun zusammenfassend noch einmal die Ergebnisse hinsichtlich der Eco R I- und Bst I-Restriktionsfragmente, die spezifisch nur mit den verschiedenen Poly(A)-RNS-Populationen hybridisieren (Tabelle II), so könnte eine mögliche Interpretation darin bestehen, daß in den Fragmenten eine große Anzahl von Unique-Genen lokalisiert ist, die mit einer ebenso großen Anzahl von Poly(A)-RNS-Molekülen hybridisieren. Gegen diese Annahme spricht allerdings, daß mRNS-Moleküle, die nur in wenigen Kopien pro Zelle vorliegen, aufgrund der kurzen Hybridisierungsdauer von 24 Stunden nicht in den Sättigungsbereich der Reaktion gelangen würden.

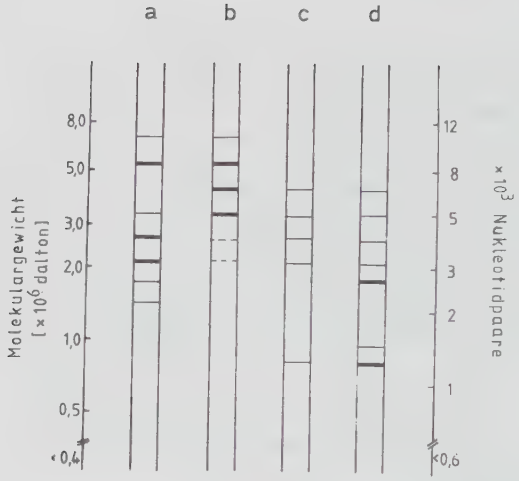


Abb. 11: Autoradiographie von Eco RI-Restriktionsfragmenten der DNS nach Hybridisierung mit ^{125}Jod-Poly(A)$^-$-RNS und ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus Keimlingen und Blüten der M.incana-Stämme 04 und 17.
Bedingungen des Restriktionsabbaus und die Hybridisierungsbedingungen wie in Abb. 10 beschrieben.
Hybridisierung mit
a) ^{125}Jod-Poly(A)$^-$-RNS (spez. Radioakt. 3,5 x 10^5 cpm/µg)
b) ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04 (spez. Radioakt. 7,7 x 10^5 cpm/µg)
c) ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 17 (spez. Radioakt. 6,5 x 10^5 cpm/µg) nach Vorhybridisierung der Eco RI-Fragmente mit unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS (2,5 µg/ml in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65 °C)
d) ^{125}Jod-Poly(A)-RNS aus Keimlingen vom Stamm 17 (spez. Radioakt. 3,5 x 10^5 cpm/µg) nach Vorhybridisierung der Eco RI-Fragmente mit unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS (2,5 µg/ml in 6 x SSC + 0,1 % SDS für 3 Std. bei 65 °C).
Behandlung der Filterstreifen nach der Hybridisierung wie in Abb. 10 beschrieben. Die Hybridisierungsbanden wurden maßstabsgetreu aufgezeichnet.

Eine weitere und die weitaus wahrscheinlichere Interpretation der Ergebnisse ist die, daß in den untersuchten Poly(A)-RNS-Populationen eine oder mehrere mRNS-Klassen in hoher Abundanz vorliegen, die von Unique-Genen codiert werden, und die innerhalb der Hybridisierungszeit von 24 Stunden den Sättigungsbereich der Reaktion erreichen.

Tabelle II: Bst I- und Eco R I-Restriktionsfragmente mit spezifischen, für Poly(A)-RNS codierenden Sequenzen

	Poly(A)-RNS			Länge der Fragmente (Bp)
	Blüten St. 04	Blüten St. 17	Keimlinge St. 17	
Bst I - Fragmente (MG x 10^6 Dalton)	2,60			3.940
	1,23	1,23	1,23	1.870
	0,91	0.91	0,91	1.370
	0,68			1.030
		0,46	0,46	700
		0,40	0,40	600
Eco RI-Fragmente (MG x 10^6 Dalton)	4,07	4,07	4,07	6.170
		0,92		1.390
		0,77	0,77	1.170

3.6 In-vitro-Translation der Poly(A)-RNS in zellfreien Proteinsynthese-Systemen

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität und um Aussagen über eine Spezifität der Poly(A)-RNS, wie sie sich bei der Hybridisierung mit den Restriktionsfragmenten (vgl. Kapitel 3.5) äußert, machen zu können, wurde die Poly(A)-RNS aus verschiedenen M.incana-Stämmen und Entwicklungsstadien in zellfreien Proteinsynthese-Systemen aus Weizenkeimen und aus Kaninchen-Reticulocyten untersucht.
Ausgehend von den Überlegungen, die in den Kapiteln 3.4.4 und 3.5 angestellt wurden, daß aufgrund der unterschiedlichen Anthocyanpigmentierung in den einzelnen M.incana-Stämmen auch Unterschiede in den mRNS-Populationen und somit auch in den daraus resultierenden Enzymen und Proteinen zu erwarten sind, soll zunächst einmal auf die genetischen Grundlagen der Biosynthese der Anthocyanpigmente und auf die Unterschiede im Genotyp der einzelnen M.incana-Stämme eingegangen werden.

3.6.1 Genetik der Anthocyan-Biosynthese

Entscheidend für das Auftreten einer intakten Anthocyan-Biosynthese sind die komplementären Grundfaktoren e^+, g^+, f^+ (Abb. 12; Seyffert, 1971), während die Modifikatorgene b^+, l^+, u^+ und v^+ für die Quantität und das Qualitätsmuster der Anthocyane verantwortlich sind: Das Allelenpaar b/b^+ bestimmt den Anthocyanidintyp, l/l^+ die Glucosidierung und v/v^+ die Acylierung der Anthocyane. Das Allelenpaar u/u^+, das eine multiple pleiotrope Wirkung zeigt, nimmt Einfluß auf die Glucosidierung und Acylierung der Anthocyane (Abb. 13; Seyffert, 1971).

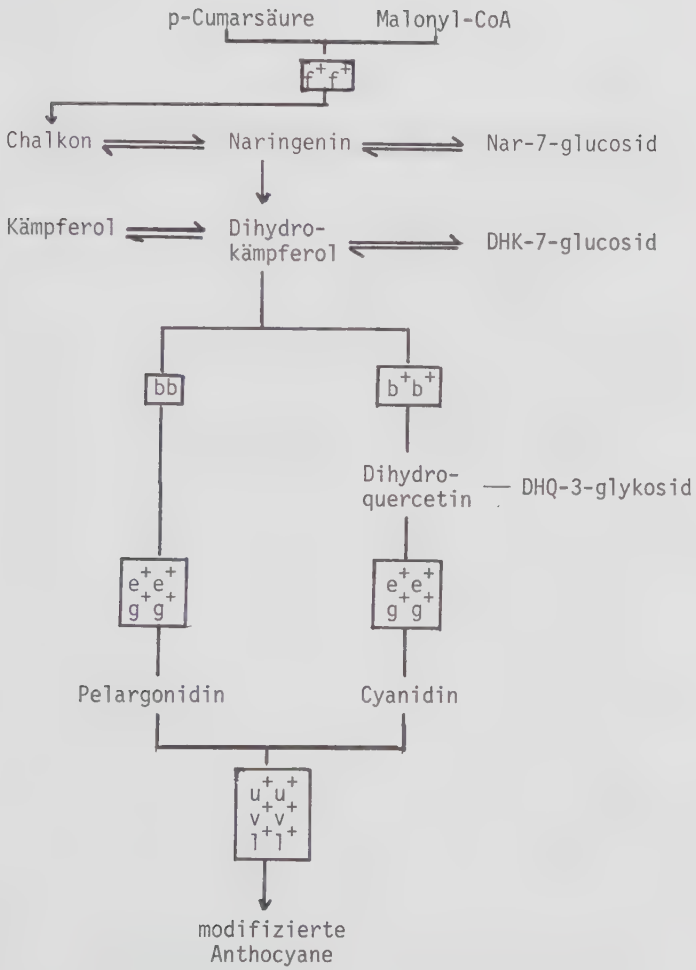
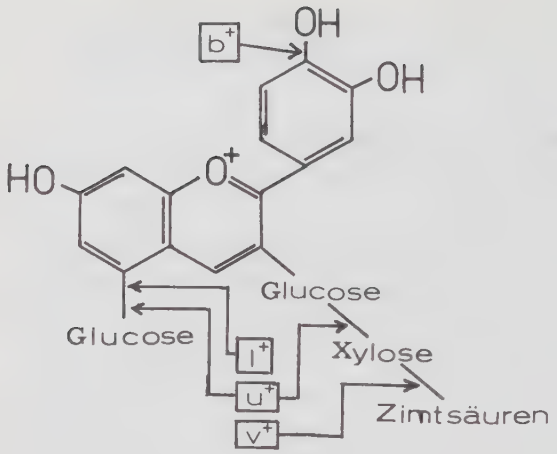


Abb. 12: Zusammenhang einzelner Flavonoid-Klassen und die Positionen der Genwirkungen (nach Spribille, 1979)



Zimtsäuren: p-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffesäure → u^+ ; Sinapinsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure → v^+

Abb. 13: Wirkungsmuster der Allele b^+, l^+, u^+ und v^+ (nach Seyffert, 1962)

Bei den in diesen Versuchen verwendeten M.incana-Stämmen, deren Genotyp in Tabelle III aufgeführt sind, lassen sich zusammenfassend folgende Unterschiede feststellen:

- Stamm 17 bildet gelblich-weiße Blüten aus, da aufgrund der rezessiven Allele im e-Locus keine Anthocyane synthetisiert werden. Durch das Vorliegen von dominanten Allelen im l-Locus sollte jedoch eine aktive Anthocyan-5-Glucosyltransferase gebildet werden, obwohl dies aufgrund der unterbrochenen Anthocyan-Synthese nicht nachgewiesen werden kann.

- Stamm 04 synthetisiert Anthocyane vom Cyanidintyp. Die Blüten dieses Stammes enthalten 3,5-Triglucoside, da durch die dominant vorliegenden Allele im 1-Locus eine aktive Anthocyan-5-Glucosyltransferase gebildet wird.

- Stamm 06 synthetisiert gleichfalls Anthocyane vom Cyanidintyp, zeigt aber aufgrund der rezessiven Allele im 1-Locus keine Anthocyan-5-Glucosyltransferase-Aktivität, so daß in den Blüten dieses Stammes nur in 3-Position, nicht aber in 5-Position substituierte Anthocyane auftreten.

Zunächst soll überprüft werden, ob sich die genotypischen Unterschiede zwischen den einzelnen M.incana-Stämmen möglicherweise bereits im In-vivo-Proteinmuster der Blüten manifestieren.

Tabelle III: Genotyp der M.incana-Stämme 04, 06 und 17

M.incana Stamm	Komplementäre Grundfaktoren für Färbung			Modifikatoren für Anthocyane				Phänotyp der Blüten	
	e	g	f	b	l	u	v	Flavonoide	Farbe
04	+	+	+	+	+	+	v	acylierte Cyanidin-3,5-Triglucoside	leuchtend lila
06	+	+	+	+	l	+	v	acylierte Cyanidin-3-Bioside	braun-violett
17	e	+	+	b	+	+	+	Kämpferol-glucoside	gelblich-weiß

3.6.2 In-vivo-Proteinmuster in Blüten von M.incana

Um eine eventuelle Änderung im Proteinmuster auf dem Hintergrund der unterschiedlichen Genotypen der einzelnen M.incana-Stämme feststellen zu können, wurden aus den Blüten der Stämme 04, 06 und 17 sowohl die Gesamt-Proteine als auch einzelne Protein-Fraktionen durch eine sukzessive Fällung mit Ammoniumsulfat isoliert und auf 10-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt.
Aus der Konzentrationsbestimmung der Gesamt-Proteine mit der Methode von Lowry (1951) wird zunächst einmal deutlich, daß aus den Blüten vom Stamm 06 im Vergleich zu den Blüten der beiden Stämme 04 und 17 bei Aufarbeitung jeweils der gleichen Menge Frischgewicht eine um etwa 40 % geringere Proteinausbeute erzielt wird. Nach den Ergebnissen von Forkmann (persönliche Mitteilung) ist in den Blüten vom Stamm 06 auch die Quantität der Anthocyane stark reduziert.

Vergleicht man die Proteinmuster aus den Blüten der verschiedenen M.incana-Stämme untereinander, so sind qualitativ keine nennenswerten Unterschiede in den Gesamt-Proteinen zu beobachten (Abb. 14). In den Blüten aller Stämme ist eine große Anzahl verschiedener Proteine zu erkennen, deren Molekulargewichte in einem Größenbereich von etwa 120.000 Dalton bis kleiner als 10.000 Dalton liegen.
Bei den Protein-Fraktionen, die durch eine sukzessive Erhöhung der Ammoniumsulfat-Konzentration isoliert wurden, treten innerhalb der einzelnen Fällungsschritte charakteristische Protein-Banden auf (Abb. 14, b-f). Jedoch sind auch hier kaum qualitative Unterschiede zwischen den Blüten der verschiedenen Stämme zu erkennen. Bis auf einige wenige Unterschiede hauptsächlich in den Protein-Banden bei der Fällung von 40-60 % und 60-80 % Ammoniumsulfat unterscheiden sich die Blütenproteine auch quantitativ nur unerheblich.
Diese weitgehende Übereinstimmung in den Proteinmustern könnte

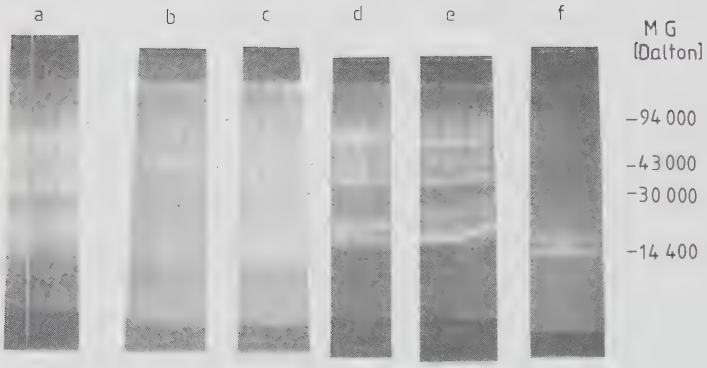


Abb. 14: In-vivo-Proteinmuster der Gesamt-Proteine und der Protein-Fraktionen nach sukzessiver Fällung mit Ammoniumsulfat aus den Blüten der M.incana-Stämme 04, 06 und 17.
a) Gesamt-Proteinmuster aus den Blüten der Stämme 04, 06 und 17.
Protein-Fraktionen aus den Blüten der Stämme 04, 06 und 17 nach Fällung mit
b) 0-20 %, c) 20-40 %, d) 40-60 %, e) 60-80 % und f) 80-100 % Ammoniumsulfat.

darauf beruhen, daß die Proteine in unmarkierter Form aus den Blüten isoliert wurden und daher nur ein Überblick über den stationären Zustand der Proteinsynthese gewonnen werden kann. Genauere Aussagen über den Ablauf der Protein-Biosynthese lassen sich erst machen, wenn die Blüten-Proteine mit radioaktiven Vorstufen markiert werden. Einer In-vivo-Markierung der Blüten-Proteine stehen allerdings zu große methodische Schwierigkeiten entgegen.
Die direktere Methode zum Nachweis spezifischer Proteinmoleküle liegt daher in der In-vitro-Translation der einzelnen mRNS-Populationen aus den Blüten der verschiedenen M.incana-Stämme in einem zellfreien Proteinsynthese-System.

3.6.3 In-vitro-Proteinsynthese im zellfreien Weizenkeim-S30-System

Zur In-vitro-Translation der verschiedenen mRNS-Populationen wurden zwei unterschiedliche zellfreie Systeme benutzt, von denen das eine pflanzlicher, das andere tierischer Herkunft ist. Im pflanzlichen System, das aus Weizenkeimen gewonnen wird, wurde zunächst die Poly(A)-RNS und auch die Poly(A)$^-$-RNS aus den Blüten der beiden M.incana-Stämme 04 und 06 untersucht.

Zur Herstellung des zellfreien Proteinsynthese-Systems wurde aus den Weizenkeimen die S-30-Fraktion isoliert, d.h. die Fraktion, die nach der Homogenisation der Weizenkeime durch die Zentrifugation bei 30.000 x g im Überstand bleibt. Mit diesem S-30-Extrakt wurde nach den Angaben von Roberts und Paterson (1973) ein Reaktionsgemisch hergestellt, das alle zur Translation einer mRNS notwendigen Komponenten sowie die mit ^{35}Schwefel radioaktiv markierte Aminosäure Methionin enthielt. Die von den einzelnen RNS-Populationen in-vitro synthetisierten Proteine wurden auf 10-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen aufge-

trennt und fluorographisch ausgewertet (vgl. Kapitel 2.10).

Bei einem Vergleich der Proteinprodukte, die von den verschiedenen RNS-Populationen aus den Blüten der Stämme 04 und 06 synthetisiert werden, ist festzustellen, daß ein breites Spektrum von Proteinen mit Molekulargewichten von 120.000 bis kleiner 10.000 Dalton gebildet wird, wobei der größte Teil der Proteine im Bereich von 50.000-20.000 Dalton liegt (Abb. 15).
Da in diesen Versuchen ein Weizenkeim-Extrakt verwendet wurde, dessen endogene mRNS vor der Translation der exogenen RNS-Populationen nicht abgebaut wurde, kann aus dem Ergebnis des Kontrollexperiments ohne exogene RNS (Abb. 15, a) abgeleitet werden, daß eine ganze Reihe von Proteinen, vor allem im Molekulargewichtsbereich von etwa 15.000 Dalton bis kleiner 10.000 Dalton, auf Weizenkeim-interne mRNS zurückzuführen ist.
Unter Berücksichtigung dieser von der Weizenkeim-mRNS synthetisierten Proteine wird deutlich, daß die Poly(A)$^-$-RNS aus den Blüten der beiden Stämme 04 und 06 nur eine geringe Translationsaktivität im In-vitro-Proteinsynthese-System besitzt (Abb. 15, b und c).
Bei der Analyse der einzelnen Proteinprodukte wird ein Protein identifiziert, das spezifisch von der Poly(A)$^-$-RNS translatiert wird, und dessen Molekulargewicht etwa 30.500 Dalton beträgt. Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß dieses Protein von einer mRNS codiert wird, die erstens nicht polyadenyliert ist, und zweitens andere informative Sequenzen enthält als die Poly(A)-RNS. Dagegen sind einige Protein-Banden zu erkennen, die identisch mit solchen sind, die auch von der Poly(A)-RNS synthetisiert werden. Dieses Ergebnis läßt zwei Möglichkeiten der Interpretation zu: Ein Teil der Poly(A)-RNS besitzt zu kurze Poly(A)-Sequenzen, um bei der Affinitätschromatographie an die Poly(U)-Sepharose binden zu können und wird dadurch zusammen mit der Poly(A)$^-$-RNS eluiert. Die zweite Möglichkeit ist die, daß die nicht polyadenylierte mRNS und die Poly(A)-RNS teilweise die gleichen informativen Sequenzen besitzen, d.h. für die gleichen Proteine codieren.

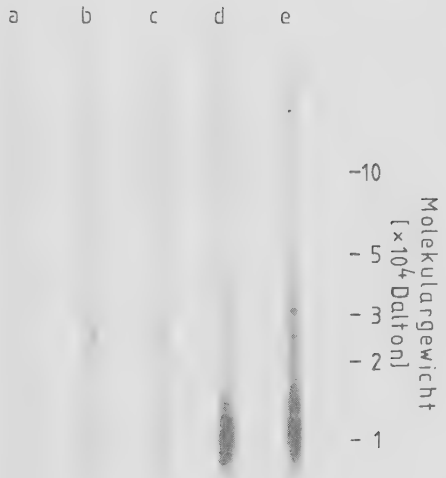


Abb. 15: Autoradiographische Auswertung der In-vitro-Proteinsynthese mit Poly(A)⁻-RNS und Poly(A)-RNS aus den Blüten der M.incana-Stämme 04 und 06 im zellfreien Weizenkeim-System nach der Elektrophorese der mit ^{35}S-Methionin (10 µCi/Ansatz) radioaktiv markierten Proteinprodukte in 10-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen.
In-vitro-Proteinsynthese
a) ohne Zusatz von exogener RNS (= Kontrolle);
b) mit 4 µg Poly(A)⁻-RNS aus Blüten vom Stamm 04;
c) mit 4 µg Poly(A)⁻-RNS aus Blüten vom Stamm 06;
d) mit 1 µg Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04;
e) mit 1 1g Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 06.

Vergleicht man nun die Proteinsynthese-Aktivität der Poly(A)-RNS-Populationen aus den Blüten der M.incana-Stämme 04 und 06, so wird zunächst deutlich, daß die Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 06 bei gleichem Mengeneinsatz im In-vitro-System eine wesentlich höhere Translationsaktivität besitzt (Abb, 15, d und e). Dieses Ergebnis scheint ungewöhnlich im Hinblick darauf, daß in den Blüten vom Stamm 06 in-vivo quantitativ weniger Proteine vorhanden sind (vgl. Kapitel 3.6.2).
Ein weiterer und wesentlicher Unterschied zwischen den mRNS-Populationen aus den Blüten beider Stämme ergibt sich aus der Analyse der einzelnen Proteinprodukte: Von beiden mRNS-Populationen wird ein Protein vom Molekulargewicht 29.000 Dalton synthetisiert, das jedoch bei der In-vitro-Translation der mRNS-Population aus den Blüten vom Stamm 06 stark angereichert wird. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß entsprechend der Anreicherung des Proteins auch die mRNS, die für dieses Protein codiert, angereichert sein und in der mRNS-Population der Blüten vom Stamm 06 in einer erhöhten Kopienzahl vorliegen muß.

3.6.4 In-vitro-Proteinsynthese im zellfreien Kaninchen-Reticulocyten-Lysat

Das In-vitro-Proteinsynthese-System tierischer Herkunft aus Kaninchen-Reticulocyten (Fa. Amersham-Buchler) wurde zur In-vitro-Translation der Poly(A)-RNS aus den Blüten der M.incana-Stämme 04, 06 und 17 sowie der Poly(A)-RNS aus den Keimlingen vom Stamm 17 (Anzucht 4 Tage unter Dauerlicht) benutzt. Die resultierenden Proteinprodukte wurden auf 10-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.10). Die autoradiographische Auswertung der Proteinprodukte der verschiedenen mRNS-Populationen ist in Abbildung 16 dargestellt.

Im Kontrollexperiment, in dem keine RNS eingesetzt wurde, sind einige radioaktiv markierte Proteine zu erkennen (Abb. 16, a), obwohl das Reticulocyten-Lysat mit einer Nuklease inkubiert worden war. Dies deutet darauf hin, daß ein Teil der endogenen mRNS des Reticulocyten-Lysats gegenüber der Nuklease-Behandlung insensitiv ist.

Wie im zellfreien Weizenkeim-System synthetisieren die verschiedenen mRNS-Populationen auch im Reticulocyten-Lysat eine große Anzahl von Proteinen, deren Molekulargewichte in einem Bereich zwischen 120.000 Dalton bis zu kleiner als 10.000 Dalton liegen, wobei sich der größte Teil der Proteine über einen Bereich von 80.000-20.000 Dalton erstreckt.

Auch in diesen Versuchen wird deutlich, daß die mRNS-Population aus den Blüten vom Stamm 04 eine wesentlich geringere Translationsaktivität besitzt als die mRNS-Population aus den Blüten vom Stamm 06 und auch als diejenige aus den Blüten vom Stamm 17. Ein weiterer Unterschied in der Aktivität besteht auch zwischen den mRNS-Populationen aus den Keimlingen und aus den Blüten des gleichen Stammes 17.

Diese Aktivitätsunterschiede der mRNS trotz gleichem Mengeneinsatz im In-vitro-Translationssystem deuten möglicherweise auf ein Regulationsphänomen hin. So wäre vorstellbar, daß im Fall des M.incana-Stammes 17 in den Blüten bestimmte mRNS-Klassen innerhalb der gesamten mRNS-Population aufgrund des höheren Differenzierungsgrades dieses Gewebes in erhöhter Abundanz im Vergleich zu den Keimlingen vorkommen. Andere Regulationsprinzipien müssen jedoch angenommen werden, wenn man die Aktivitätsunterschiede in den mRNS-Populationen aus den Blüten der verschiedenen Stämme gesondert betrachtet. So könnte die geringere Translationsaktivität der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04 darauf hindeuten, daß einerseits diese mRNS einem schnelleren "turnover" unterliegt und teilweise schon abgebaut wird, bevor sie zur Translation gelangt, und andererseits, daß die mRNS-Populationen aus den Blüten der Stämme 06 und 17 durch ihre längere Lebensdauer häufiger in den Translationscyclus eingehen, und ihre Proteinprodukte daher quantitativ häufiger synthetisiert werden könnten.

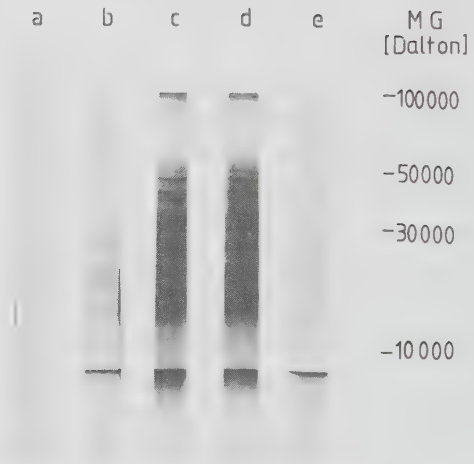


Abb. 16: Autoradiographische Auswertung der In-vitro-Proteinsynthese mit jeweils 0,5 µg Poly(A)-RNS aus Keimlingen und Blüten der M.incana-Stämme 04, 06 und 17 im zellfreien Kaninchen-Reticulocyten-System in Anwesenheit von ^{35}S-Methionin (25 µCi/Ansatz) nach Elektrophorese der Proteinprodukte in 10-20 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen.
In-vitro-Proteinsynthese
a) ohne Zusatz exogener RNS (Kontrolle);
b) mit Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 04;
c) mit Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 06;
d) mit Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 17;
e) mit Poly(A)-RNS aus den Keimlingen vom Stamm 17.

Werden die einzelnen Proteinprodukte miteinander verglichen, so ist festzustellen, daß die verschiedenen Poly(A)-RNS-Populationen im In-vitro-Reticulocytensystem nahezu identische Proteine synthetisieren (Abb. 16, b-e). Läßt man die Unterschiede in der Translationsaktivität zwischen den einzelnen mRNS-Populationen außer Betracht, so sind die verschiedenen Proteinprodukte auch quantitativ miteinander vergleichbar, jedoch mit einer Ausnahme: Wie im Weizenkeim-System wird auch im Reticulocyten-Lysat das Protein vom Molekulargewicht 29.000 Dalton von allen mRNS-Populationen gleichermaßen synthetisiert, jedoch wird es auch in diesem Fall bei der Translation der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 06 in erhöhtem Ausmaß angereichert und konzentriert sich in einer klar definierten Bande (Abb. 16, c). Einmal mehr legt dieses Ergebnis den Schluß nahe, daß die mRNS, die für dieses Protein codiert, in der mRNS-Population der Blüten vom Stamm 06, gegenüber der entsprechenden mRNS in den anderen untersuchten Populationen, in einer weit höheren Kopienzahl vorliegen muß.

4. DISKUSSION

Um Informationen über die Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung der Blütenpflanze Matthiola incana zu gewinnen, und um M.incana auf dem Niveau der Transkription mit anderen höheren Pflanzen und mit tierischen Eukaryonten vergleichen zu können, wurde in dieser Arbeit zunächst die RNS als ein Primärprodukt der Genexpression näher charakterisiert.

Von den verschiedenen RNS-Arten ist die ribosomale RNS von M.incana am besten untersucht. Es liegen Daten über ihr Molekulargewicht sowie über die Organisation und Expression ihrer Gene vor (Grierson und Hemleben, 1977; Friedrich et al., 1979). Das hier gefundene Molekulargewicht von 1,3 x 10^6 Dalton (25S rRNS) und 0,7 x 10^6 Dalton (18S rRNS) stimmt sowohl mit den bereits früher für die ribosomale RNS von M.incana gefundenen Werten (Grierson und Hemleben, 1977) als auch mit den normalerweise für die ribosomale RNS höherer Pflanzen (z.B. Erbse, Bohne, Mais) angegebenen Werten überein (Loening, 1968). Das Molekulargewicht der ribosomalen RNS-Komponenten aus Chloroplasten entspricht mit 1,05 x 10^6 Dalton und 0,52 x 10^6 Dalton demjenigen der ribosomalen RNS der Prokaryonten. Unter den denaturierenden Bedingungen der Formamid-Behandlung beträgt das Molekulargewicht der cytoplasmatischen rRNS 1,25 x 10^6 Dalton (25 S) und 0,64 x 10^6 Dalton (18 S).
Weit weniger Informationen liegen bisher für die Poly(A)-RNS von M.incana vor. Diese wurde zunächst ebenfalls anhand ihres Molekulargewichts charakterisiert, das unter denaturierenden Bedingungen durchschnittlich 3,9 x 10^5 Dalton beträgt, was einer mittleren Länge von 1.200 Nukleotiden entspricht. Ein ähnliches Molekulargewicht von 4 x 10^5 Dalton fanden Grierson und Hemleben (1977) für die Poly(A)-RNS aus Wurzeln und Kotyledonen von M.incana-Keimlingen. Diesen Werten vergleichbar ist die

durchschnittliche Länge der Poly(A)-RNS aus Baumwolle (1.150 Nukleotide ≙ 5 x 10^5 Dalton: Walbot und Dure, 1976), aus Blättern der Tabakpflanze (1.340 ± 85 Nukleotide ≙ 4,5 x 10^5 Dalton: Goldberg et al., 1978), aus anderen höheren Pflanzen (Key und Silflow, 1975; Gray und Cashmore, 1976) und aus Eukaryonten allgemein (Davidson und Britten, 1973).

Zur Untersuchung des Hybridisierungsverhaltens der Poly(A)-RNS und zur Berechnung der Anzahl der in einem definierten Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstadium aktiv transkribierten Gene war es notwendig, eine möglichst reine Poly(A)-RNS mit einer hohen spezifischen Radioaktivität zu isolieren. Unter den angewendeten Versuchsbedingungen war es jedoch nicht möglich, eine Poly(A)-RNS zu gewinnen, die völlig frei von meßbaren Verunreinigungen durch ribosomale RNS-Komponenten war (vgl. Kapitel 3.3 und 3.4). Der Grund dafür liegt erstens darin, daß als Resultat der Cäsiumchlorid-Zentrifugation RNS-Aggregate auftreten, die sich auch durch eine Hitzedenaturierung vor der Affinitätschromatographie auf Poly(U)-Sepharose bzw. Oligo(dT)-Cellulose nicht vollständig auflösen. Selbst bei einer vorhergehenden Behandlung mit Dimethylsulfoxid, die Molekülaggregate zwischen Poly(A)-RNS und rRNS zerstört (Bantle et al., 1976), wird noch eine Verunreinigung durch ribosomale RNS-Sequenzen gefunden (Silflow et al., 1979). Zweitens war für die Sättigungshybridisierungsversuche eine Poly(A)-RNS mit einer hohen spezifischen Radioaktivität erforderlich. Bei langen radioaktiven Markierungszeiten, wie sie in diesen Versuchen angewendet wurden, erreicht jedoch die spezifische Radioaktivität der ribosomalen RNS die der Poly(A)-RNS und wird damit meßbar (vgl. Kapitel 3.3 und 3.4). Obwohl die Verunreinigung der Poly(A)-RNS nicht mehr als 5-10 % betrug, führte sie in den ersten Hybridisierungsversuchen zu einer wesentlichen Beeinträchtigung der Ergebnisse. Jedoch konnte für dieses Problem mit dem in Kapitel 3.4.1 dargestellten

Experiment eine Lösung gefunden werden: Die Vorhybridisierung der Filter-gebundenen DNS mit unmarkierter Poly(A)$^-$-RNS führte zu einer vollständigen Absättigung der ribosomalen Gene, so daß die als Verunreinigung vorhandene ribosomale RNS in der nachfolgenden Sättigungshybridisierung mit der Poly(A)-RNS keine komplementären DNS-Sequenzen mehr findet und Hybridbindungen nur noch zwischen der Poly(A)-RNS und den entsprechenden DNS-Sequenzen zustande kommen.

Die mit dieser Methode erhaltenen Daten der Sättigungshybridisierungsversuche wurden in die Regressionsanalyse für eine Ein-Komponenten-Reaktion eingesetzt, und der Sättigungswert sowie die Halbwertszeit der Hybridisierungsreaktionen berechnet (vgl. Abb. 6, 7 und 9).
Bei der Hybridisierung mit den mRNS-Populationen aus Licht- und Dunkel-Keimlingen konnte bei langen Inkubationszeiten (96-120 Stunden) beobachtet werden, daß die Meßpunkte oberhalb des errechneten Sättigungswertes von 0,22 % bzw. 0,18 % lagen (vgl. Abb. 6). Obwohl der "Exakte Test auf Linearität der Regressionsfunktion" keine signifikante Abweichung von einer Ein-Komponenten-Reaktion ergab, legten diese Ergebnisse die Vermutung nahe, daß an der Hybridisierungsreaktion nicht nur eine kinetische Komponente beteiligt war. Darüberhinaus ergab sich bei der Sättigungshybridisierung mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten von M.incana eine vergleichsweise sehr kurze Halbwertszeit, die auf eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit schließen läßt, und die Meßwerte bei langen Inkubationszeiten lagen ebenfalls über dem Sättigungsplateau (vgl. Abb. 9).
Mehrere Erklärungen für diese Ergebnisse sind denkbar:

1. Möglicherweise enthielt die Poly(A)-RNS, die aus der gesamten zellulären RNS isoliert wurde, sowohl cytoplasmatische als auch nukleare Poly(A)-RNS. Da die heterogene nukleare RNS (hnRNS) vor dem Processing neben den informativen zusätzlich intervenierende, repetitive Sequenzen besitzt (Darnell, 1979), könnte sie die schneller hybridisierende Komponente darstellen.

Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch, daß bei radioaktiven Markierungsversuchen selbst nach kurzen Markierungszeiten aufgrund des raschen Processing der hnRNS nur ein geringer Teil der zellulären Poly(A)-RNS im Zellkern gefunden wird (Silflow et al., 1979). Daher sollte der größte Teil der Poly(A)-RNS cytoplasmatisch sein, während nukleare Poly(A)-RNS nur in schwer meßbaren Quantitäten vorhanden wäre.

2. Eine zweite mögliche Erklärung besteht darin, daß ein Teil der Poly(A)-RNS von repetitiven DNS-Sequenzen abgelesen wird, d.h. daß einige Gene, die für die Poly(A)-RNS codieren, einen hohen Repetitionsgrad im Genom haben.
   In einigen Eukaryonten, vor allem in Säugerzellen, existiert eine mRNS-Klasse, die von repetitiven DNS-Sequenzen transkribiert wird und die einen Anteil von 10 % bis zu 30 % der gesamten mRNS erreicht (Spradling et al., 1974; Campo und Bishop, 1974; Monahan et al., 1976; Timberlake et al., 1977). Sowohl für M.incana als auch für mehrere andere höhere Pflanzen konnte jedoch gezeigt werden, daß die Poly(A)-RNS fast ausschließlich von Unique-DNS-Sequenzen transkribiert werden, die einmal bis maximal fünfmal pro haploidem Genom vorhanden sind (Goldberg et al., 1978; Silflow et al., 1979; Kiper et al., 1979; Wenzel, 1980).

3. Mehrere Autoren postulieren, daß einige der repetitiven Sequenzen, die in der mRNS-Population vorhanden sind, kovalent an die nicht-repetitiven Sequenzen der mRNS gebunden sind. Crippa et al. (1973) und Dina et al. (1974) zeigten, daß repetitive Sequenzen als Teil der mRNS-Moleküle aus Xenopus am 5'-Ende des Moleküls vorhanden sind. Firtel und Lodish (1973) und Lodish et al. (1973) fanden, daß etwa 10 % der cytoplasmatischen und 25 % der nuklearen Poly(A)-RNS aus Dictyostelium von repetitiver DNS transkribiert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen schlugen die Autoren folgendes Modell vor: Beim Transport der nuklearen RNS ins

Cytoplasma wird der größte Teil der repetitiven Sequenzen durch das Processing abgespalten und die cytoplasmatische mRNS behält am 5'-Ende und vielleicht auch am 3'-Ende des gleichen Moleküls kurze Transkripte repetitiver Sequenzen. Diesem Modell stehen jedoch die Ergebnisse anderer Autoren gegenüber (vgl. Punkt 2.), wonach die mRNS-Populationen zwar Transkripte repetitiver Sequenzen enthalten, die aber nicht kovalent gebunden sind, sondern eine eigene, aus diesen Transkripten repetitiver Sequenzen bestehende mRNS-Klasse darstellen (Spradling et al., 1974; Campo und Bishop, 1974; Monahan et al., 1976; Timberlake et al., 1977).

4. Die vierte Möglichkeit der Interpretation besteht darin, daß in der Poly(A)-RNS von M.incana eine oder mehrere mRNS-Klassen in unterschiedlich hoher Abundanz vorkommen, d.h. daß von einem Single-copy-Gen nicht nur eine, sondern mehrere bis viele Kopien pro Zelle vorhanden sind. Die Existenz verschiedener mRNS-Abundanzklassen ist für viele Eukaryonten gut belegt. Davidson und Britten (1979) teilen die Komponenten von mRNS-Populationen tierischer Herkunft aufgrund ihres Hybridisierungsverhaltens in drei Kategorien ein: Die "complex class mRNAs" mit einer bis wenigen Kopien pro Zelle, die "moderately prevalent mRNAs" mit bis zu einigen hundert Kopien pro Zelle, und die "superprevalent mRNAs" mit bis zu mehr als 10^4 Kopien pro Zelle. Im Normalfall enthalten tierische Zellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad zum größten Teil mRNS-Klassen, die der ersten und zweiten Kategorie angehören. Die dritte Kategorie, die "superprevalent mRNAs", ist spezifisch für bestimmte, hoch differenzierte Zelltypen, wie etwa die Ovalbumin-mRNS in Hühner-Ovidukten (Sullivan et al., 1973; Harris et al., 1973 und 1975) oder die Globin-mRNS in Maus- und Hühner-Erythrocyten (Bishop und Rosbash, 1973; Hunt, 1974) und ihre Syntheserate unterliegt während terminalen Differenzierungsprozessen starken Änderungen (Harris et al., 1975; Daneholt, 1975; Hunt, 1976).

Für mehrere höhere Pflanzen und auch für M.incana wurde ebenfalls die Existenz abundanter mRNS-Klassen beschrieben (Goldberg et al., 1978; Kiper et al., 1979; Silflow et al., 1979; Wenzel, 1980). Wie in tierischen Zellen scheint auch in Pflanzen die Abundanz einzelner mRNS-Klassen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen zu variieren: In Wurzel-Kalluszellen der Petersilie stellt ein breites Spektrum von 960 verschiedenen mRNS-Spezies die abundante mRNS-Klasse dar, die in einer Frequenz von 60 Kopien pro Zelle vorkommt, während in den Blättern der Petersilie eine abundante Klasse von nur etwa 30 verschiedenen mRNS-Spezies vorliegt, die aber einen Anteil von 30 % an der gesamten mRNS-Population darstellt und in einer Frequenz von mehr als 1.000 Kopien pro Zelle vorhanden ist (Kiper et al., 1979).

Die in Punkt 4 gegebene Interpretation der Hybridisierungsergebnisse gilt mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die mRNS-Populationen von M.incana. Darüberhinaus ist möglicherweise auch eine Änderung in der Frequenz von abundanter Poly(A)-RNS in den mRNS-Populationen aus den Keimlingen und Blüten von M.incana in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad zutreffend. Obwohl bei der angewendeten Methode der Sättigungshybridisierung mit der Filtertechnik direkte Frequenzberechnungen nicht möglich sind, kann durch einen Vergleich der Halbwertszeiten der Hybridisierungsreaktionen indirekt auf unterschiedliche Frequenzen geschlossen werden. So läßt die vergleichsweise sehr kurze Halbwertszeit bei der Hybridisierung mit Poly(A)-RNS aus Blüten vermuten, daß eine oder auch mehrere abundante mRNS-Sequenzen in weit höheren Kopienzahlen pro Zelle vorhanden sind als in den Keimlingen von M.incana.

Ausgehend vom DNS-Gehalt von M.incana von 1,5 pg pro haploidem Genom (Grierson und Hemleben, 1977), sowie von der informativen Länge eines Unique-Gens von 1.050 Nukleotiden (Wenzel und Hemleben, 1979), wurde aus den Ergebnissen der Sättigungshybridisierungsversuche die Anzahl der aktiven Gene berechnet. In Keimlingen von M.incana wurden annähernd 5.000 Gene (Dunkel-Keimlinge) bzw. 6.000 Gene (Licht-Keimlinge) aktiv transkribiert. In Blüten von M.incana wurde eine Zahl von 6.800 aktiven Genen berechnet (vgl. Tabelle II). Diesen Berechnungen liegt die Annahme zugrunde, daß die Transkription asymmetrisch, d.h. nur von einem DNS-Strang geschieht. Nur bei den Histongenen von Drosophila konnten Lifton et al. (1977) einen davon abweichenden Fall demonstrieren.

Die erhaltenen Werte liegen etwas niedriger als die von Wenzel (1980) für die Keimlinge von M.incana angegebenen Daten von etwa 9.000 aktiv transkribierten Genen, die durch die Hybridisierung von ^{3}H-cDNS und Poly(A)-RNS in Lösung gefunden wurden. Diese Unterschiede zwischen den Ergebnissen können damit begründet werden, daß in den hier beschriebenen Sättigungshybridisierungen erstens nur ein etwa 10-facher Exzeß an Poly(A)-RNS eingesetzt wurde (gegenüber einem etwa 100-fachen Exzeß bei der Hybridisierung mit ^{3}H-cDNS in Lösung; Wenzel, 1980), und zweitens, daß mit der Methode der Filtertechnik Poly(A)-RNS-Moleküle, die erst bei sehr hohen Rot-Werten renaturieren, nur schwer erfaßt werden können.

Kiper et al. (1979) fanden vergleichbare Zahlen von 13.700 bzw. 12.300 aktiven Genen bei der Hybridisierung von Unique-DNS und polysomaler mRNS aus Wurzel-Kalluszellen und Blättern der Petersilie. Nach der ^{3}H-cDNS-Methode, wie sie auch von Wenzel (1980) angewendet wurde, schätzten Kiper et al. (1979) 11.500 bzw. 9.200 aktive Gene. Goldberg et al. (1978) berechneten dagegen, daß 5,2 % der Single-copy-DNS in der polysomalen mRNS aus Blättern der Tabakpflanze repräsentiert sind, was einer Anzahl von 27.000 Genen entsprechen würde. Jedoch ist diese Zahl etwa 2,5-mal höher als die von etwa 11.000 Genen, welche von den

Autoren mit Hilfe der ^{3}H-cDNS-Methode gefunden wurde. Abgesehen von dieser in Tabakblättern gefundenen Diskrepanz der Genzahlen stimmen die für höhere Pflanzen und für M.incana berechneten Daten sowohl untereinander als auch weitgehend mit den Genzahl-Schätzungen für tierische Zellen überein (Lewin, 1975).

Keine nennenswerten Unterschiede in der Anzahl der aktiv transkribierten Gene wurden in Zellen von verschiedenem Differenzierungsgrad gefunden. Sowohl in Keimlingen und Blüten von M.incana als auch in Wurzel-Kallus und Blättern der Petersilie (Kiper et al., 1979) unterscheiden sich die Genzahlen nur minimal. So scheint sich ein Unterschied zwischen den einzelnen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien höherer Pflanzen nicht in der Anzahl aktiver Gene zu manifestieren, sondern vielmehr in der Frequenz, mit der die einzelnen Gene transkribiert werden.

Darüberhinaus zeigen die angeführten Daten, daß offenbar nur ein geringer Prozentsatz der insgesamt vorhandenen Unique-DNS-Fraktion tatsächlich zur Transkription gelangt. Im M.incana-Genom ist theoretisch eine Gesamtzahl von etwa 360.000 Unique-Genen vorhanden, von denen etwa 120.000 für die polyadenylierte mRNS codieren (Wenzel und Hemleben, 1979; Wenzel, 1980). Ein Vergleich dieser Zahlen mit der Anzahl der aktiven Gene ergibt ein Verhältnis von vorhandenen zu transkribierten Genen von 60:1 bzw. von etwa 20:1. Die Annahme von Ohta und Kimura (1971), daß während der Lebensdauer eines Organismus insgesamt nur etwa 50.000 Strukturgene exprimiert werden, deutet bei einem Vergleich mit der theoretischen Gesamtzahl der Unique-Gene von M.incana darauf hin, daß ein großer Teil der vorhandenen Unique-Sequenzen offenbar überhaupt nicht transkribiert wird. Dieses Phänomen des DNS-Überschusses zeigt, daß die Auswahl der in einem spezifischen Entwicklungs- oder Differenzierungsstadium aktiv transkribierten Gene einer strengen Regulation unterliegen muß.

In allen tierischen Eukaryonten, die bisher untersucht wurden, ist die Existenz einer hnRNS erwiesen, die intervenierende Sequenzen teilweise auch repetitiven Ursprungs besitzt (Darnell, 1979), und die möglicherweise die Funktion eines Precursors der cytoplasmatischen mRNS hat (Ryskov et al., 1976; Kramerov et al., 1979). Ebenso gibt es eine Reihe von Berichten über eine hnRNS bei höheren Pflanzen, die zum Teil in polyadenylierter Form vorkommt und deren Sequenzkomplexität höher ist als die der cytoplasmatischen mRNS (Grierson und Covey, 1976; Keith et al., 1976; Goldberg et al., 1978; Kiper et al., 1979). Für M.incana liegen dagegen bisher keine Daten über die hnRNS und ihre Eigenschaften vor.

Um einen Vergleich mit der gesamten zellulären Poly(A)-RNS zu ermöglichen, wurde zur Sättigungshybridisierung mit der nuklearen RNS der polyadenylierte Anteil der Kern-RNS von M.incana verwendet. Obwohl ein direkter Nachweis über eine unmittelbare Beteiligung der Polyadenylierung am Transkriptionsprozeß noch nicht erbracht wurde, dieser Vorgang jedoch ein sehr frühes posttranskriptionales Ereignis ist und noch innerhalb des Zellkerns stattfindet (Derman und Darnell, 1974), wurde davon ausgegangen, daß die nukleare Poly(A)-RNS das primäre Transkriptionsprodukt darstellt. Die Ergebnisse zeigten, daß der Sättigungswert bei der Hybridisierung mit nuklearer Poly(A)-RNS um etwa den Faktor 5 größer ist als bei der Hybridisierung mit der gesamten zellulären, also vorwiegend cytoplasmatischen Poly(A)-RNS. Dies bedeutet, daß nur etwa 20 % der nuklearen Poly(A)-RNS ins Cytoplasma gelangen und daß die nukleare Poly(A)-RNS eine höhere Sequenzkomplexität besitzt als die cytoplasmatische Poly(A)-RNS. Ähnliche Verhältnisse liegen in den Blättern der Tabakpflanze vor, wo nur etwa 28 % der hnRNS in der polysomalen mRNS vorhanden sind und die hnRNS demnach annähernd die 4-fache Komplexität der polysomalen mRNS hat (Goldberg et al., 1978). Bei tierischen Zellen ist die Komplexität der Kern-RNS um durchschnittlich 4-5 mal größer, kann

aber auch bis mehr als 10-mal höher liegen (Hough et al., 1975; Levy et al., 1976; Kleiman et al., 1977). Eine Ausnahme bilden niedere Eukaryonten wie z.B. der Phycomycet Achlya und Hefezellen, deren Kern-RNS und cytoplasmatische mRNS identische Komplexitäten aufweisen (Hereford und Rosbash, 1977; Timberlake et al., 1977; Rozek et al., 1978). Ein Processing des Actin-Gens allerding auch bei Hefe wurde kürzlich nachgewiesen (Gallwitz, persönliche Mitteilung).

Bei der Hybridisierung mit Bst I- und Eco R I-Restriktionsfragmenten wurden im Kontrollexperiment mehrere Fragmente identifiziert, die spezifisch mit den verschiedenen Poly(A)-RNS-Populationen aus den unterschiedlichen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien von M.incana hybridisieren (vgl. Kapitel 3.5.1 und 3.5.2; Tabelle III). Dies bedeutet, daß die Fragmente spezifische DNS-Sequenzen enthalten, die für die jeweilige mRNS codieren. Aufgrund der kurzen Hybridisierungsdauer von 24 Stunden wurde aus den Ergebnissen der Schluß gezogen, daß in den einzelnen mRNS-Populationen aus den Keimlingen und Blüten der verschiedenen M.incana-Stämme eine oder mehrere Klassen der mRNS in hoher Abundanz vorliegen müssen. Die Schlußfolgerung gründet darauf, daß eine mRNS, die nur in wenigen Kopien pro Zelle vorhanden ist, innerhalb der Hybridisierungszeit von 24 Stunden den Sättigungsbereich der Hybridisierung nicht erreichen kann. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen somit auch mit jenen überein, die bereits bei der Sättigungshybridisierung mit der Filtertechnik gefunden wurden: Mit Ausnahme der Gene für die Histon-mRNS und einiger anderer, die wie die ribosomalen Gene zu den repetitiven DNS-Sequenzen gehören, d.h. mehrfach bis vielfach redundant im Genom vorkommen (Kedes und Birnstiel, 1971; Weinberg et al., 1972; Spradling et al., 1974; Campo und Bishop, 1974; Timberlake et al., 1977), werden die meisten spezifischen Genprodukte, auch wenn sie die in der Zelle am häufigsten auftretenden Transkripte darstellen, von Unique-DNS-Sequenzen co-

diert und in unterschiedlich hoher Frequenz transkribiert. Nachgewiesen ist dies bereits für die mRNS einiger höherer Pflanzen (Goldberg et al., 1978; Silflow et al., 1979; Kiper et al., 1979; Wenzel, 1980). Bei tierischen Eukaryonten sind typische Beispiele für Unique-Gene mit hoher Kopienzahl das Ovalbumin-Gen (Sullivan et al., 1973; Harris et al., 1973 und 1975), das Globin-Gen (Bishop und Rosbash, 1973; Hunt, 1974) oder die Gene für die leichten Ketten der Immunoglobuline (Tonegawa, 1976). Einen interessanten Sonderfall stellen die Gene für die Ribulosediphosphat-Carboxylase der Erbse dar. Cashmore (1979) berechnete für das Gen der kleinen Untereinheit dieses Enzyms, das im Kern-Genom lokalisiert ist, einen maximal 5-fachen Repetitionsgrad, während das im Chloroplasten-Genom lokalisierte Gen für die große Untereinheit aufgrund der Häufigkeit der Chloroplasten und der Anzahl der DNS-Moleküle pro Chloroplast mehrere tausend mal pro Zelle vorhanden ist.

Die Hybridisierungsversuche mit Restriktionsfragmenten der DNS wurden auch in der Absicht ausgeführt, eventuell eine Blüten- bzw. Stamm-spezifische mRNS-Klasse von M.incana identifizieren zu können. Eine Stamm-Spezifität der mRNS-Populationen scheint insofern gegeben, als mehrere Restriktionsfragmente, die mit den mRNS-Populationen aus Blüten und Keimlingen vom M.incana-Stamm 17 hybridisierten, bei der Hybridisierung mit der mRNS-Population aus den Blüten vom Stamm 04 nicht gefunden wurden (vgl. Tabelle III). Darüberhinaus manifestiert sich bei M.incana vom Stamm 17 eine Blüten-Spezifität in einem Eco R I-Fragment, dessen Molekulargewicht $0{,}92 \times 10^6$ Dalton beträgt. Dieses Fragment tritt bei der Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 17 zusätzlich zu jenen auf, die auch mit der Poly(A)-RNS aus den Keimlingen vom Stamm 17 identifiziert wurden. Dies scheint ein Hinweis dafür, daß in diesem Eco R I-Fragment DNS-Sequenzen lokalisiert sind, die bei Stamm 17 spezifisch im Differenzierungsstadium der Blütenbildung transkribiert werden.

Bei der Hybridisierung von Bst I-Restriktionsfragmenten trat im

Kontrollexperiment mit Poly(A)$^-$-RNS ein Phänomen auf, für das keine Erklärung gefunden werden konnte. Bei der Hybridisierung von Bst I-Fragmenten mit ribosomaler 25 S und 18 S rRNS (Friedrich et al., 1979) wurden drei Fragmente gefunden (Molekulargewicht 2,9 x 10^6 Dalton, 1,6 x 10^6 Dalton und 1,5 x 10^6 Dalton), die bei der Hybridisierung mit der Poly(A)-RNS in dem hier beschriebenen Experiment nicht vorhanden waren. Unerklärlich ist dies aufgrund der Tatsache, daß der größte Teil der Poly(A)$^-$-RNS aus ribosomaler RNS besteht. Demnach müßten sämtliche Bst I-Fragmente, die mit reiner ribosomaler RNS hybridisieren, auch mit der Poly(A)$^-$-RNS hybridisieren können.
Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß die Hybridisierung mit Restriktionsfragmenten der DNS eine Möglichkeit darstellt, Gen-Sequenzen zu identifizieren, die spezifisch für einen M.incana-Stamm bzw. für ein definiertes Entwicklungs- oder Differenzierungsstadium eines Stammes sind. Eine Anreicherung von DNS-Sequenzen mit spezifischen, für mRNS codierenden Sequenzen im präparativen Maßstab ohne die Anwendung der Clonierungstechnik erscheint damit durchführbar.

Die Frage, ob sich die Unterschiede in der Spezifität der mRNS-Populationen, wie sie sich in der unterschiedlichen Abundanz in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad, in der Spezifität der hybridisierbaren Restriktionsfragmente, vor allem aber im Hinblick auf die genetisch bedingten Unterschiede der Anthocyan-Biosynthese in verschiedenen M.incana-Stämmen äußert, auch auf der Ebene der Proteine manifestieren, wurde mit Hilfe der In-vitro-Translation der mRNS-Populationen in zellfreien Proteinsynthese-Systemen untersucht.
Im zellfreien Weizenkeim-System ergab sich zunächst ein deutlicher Unterschied in der Translationsaktivität zwischen der Poly(A)$^-$-RNS und der Poly(A)-RNS aus den Blüten der Stämme 04

und 06. Dieser Befund koinzidiert mit der Tatsache, daß die Poly(A)$^-$-RNS hauptsächlich aus ribosomaler und Transfer-RNS besteht und nur an einem geringen Anteil nicht polyadenylierter mRNS Translation erfolgen kann. Da von diesem Anteil an nicht polyadenylierter mRNS teilweise die gleichen Proteine synthetisiert werden wie von der Poly(A)-RNS, muß daraus geschlossen werden, daß beide mRNS-Klassen zum großen Teil gleiche informative Sequenzen enthalten, d.h. für die gleichen Proteine codieren. Die Ergebnisse renaturierungskinetischer Untersuchungen mit ^{3}H-cDNS und Poly(A)-RNS bzw. Poly(A)$^-$-RNS legen ebenfalls eine solche Schlußfolgerung nahe (Wenzel, 1980). Eine Ausnahme scheint allerdings in dem Protein vom Molekulargewicht 30.500 Dalton zu existieren, das ausschließlich von der Poly(A)$^-$-RNS aus den Blüten der beiden Stämme 04 und 06 synthetisiert wird. Dieses Protein wird vermutlich von einer nicht polyadenylierten mRNS codiert, die andere, von der Poly(A)-RNS verschiedene informative Sequenzen enthält.

Sowohl im Reticulocyten-Lysat als auch im Weizenkeim-System zeigte die Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 06 eine wesentlich höhere Translationsaktivität als die Poly(A)-RNS aus den Blüten der Stämme 04 und 17. Dies scheint ungewöhnlich im Hinblick darauf, daß aus den Blüten vom Stamm 06 weniger Gesamt-Protein zu isolieren ist als aus den Blüten der anderen Stämme, obwohl in-vivo die gleichen Proteine vorhanden sind (vgl. Abb. 14). Möglicherweise deutet sich hier ein für Stamm 06 spezifisches Regulationsphänomen an.

Unterschiede in der In-vitro-Translationsaktivität wurden im Reticulocyten-Lysat auch zwischen den mRNS-Populationen aus Keimlingen und Blüten des M.incana-Stammes 17 beobachtet. Dies reflektiert möglicherweise den unterschiedlichen Differenzierungsgrad der beiden Gewebe. Vorstellbar ist, daß in den Blüten bestimmte mRNS-Klassen in erhöhter Abundanz vorkommen, die sich in vergleichsweise prominenten Proteinbanden manifestieren, während in Keimlingen eher ein Spektrum vieler

verschiedener Proteine synthetisiert wird. Eine Korrelation zwischen Differenzierungsstadium und Proteinmuster besteht offensichtlich auch bei Wurzel-Kalluszellen und Blättern der Petersilie (Kiper et al., 1979). Die Genexpression unterliegt damit offenbar einer Regulation auf Transkriptionsebene.
Ein gleichartiges Regulationsprinzip trifft wahrscheinlich auf die mRNS zu, die in den Blüten von M.incana für das Protein vom Molekulargewicht 29.000 Dalton codiert. Sowohl im zellfreien Weizenkeim-System als auch im Reticulocyten-Lysat wurde dieses Protein von den mRNS-Populationen aller untersuchten M.incana-Stämme synthetisiert. In beiden Systemen wurde jedoch das 29.000-Dalton-Protein von der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 06 stark angereichert. Dies ist ein eindeutiger Hinweis dafür, daß auch die mRNS, die für dieses Protein codiert, in der mRNS-Population aus den Blüten vom Stamm 06 in erhöhter Abundanz aufgrund einer erhöhten Transkriptionsfrequenz vorliegt. Möglicherweise ist das in den Blüten vom Stamm 06 angereicherte Protein auch ein Zeichen für den Unterschied in der Anthocyan-Biosynthese der verschiedenen M.incana-Stämme. Ein konkreter Fall ist insofern denkbar, als im Stamm 06 aufgrund der rezessiv vorliegenden Allele des 1-Locus keine Anthocyan-5-Glucosyltransferase-Aktivität nachweisbar ist. Dies kann einerseits bedeuten, daß sowohl das Enzym als auch die mRNS nicht synthetisiert werden. Andererseits ist es ebenso wahrscheinlich, daß das Enzym zwar gebildet wird, jedoch in inaktiver Form vorliegt. In diesem Fall muß auch die für das Enzym codierende mRNS transkribiert werden. Ob es sich bei der mRNS für das 29.000-Dalton-Protein tatsächlich um eine verstärkte Genaktivierung handelt, die Regulation also auf Transkriptionsebene stattfindet, muß durch weitere Untersuchungen überprüft werden.
Darüberhinaus gibt dieses 29.000-Dalton-Protein eine aussichtsreiche Möglichkeit zur Identifizierung und Isolierung einer spezifischen mRNS von M.incana. Eine Anreicherung der mRNS bzw.

der entsprechenden Gen-Sequenzen könnte, wie die Ergebnisse andeuten, bereits im Agarosegel möglich sein und durch die Hybridisierung mit Restriktionsfragmenten der DNS identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung einer spezifischen mRNS besteht in der Clonierung ihrer komplementären DNS. Die dargestellten Ergebnisse bieten, in Verbindung mit den oben genannten Versuchstechniken zur Anreicherung spezifischer Gen-Sequenzen, einen erfolgversprechenden Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur Genexpression und Genregulation bei M.incana.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die höhere Pflanze Matthiola incana (Brassicaceae) wurde für Untersuchungen zur Genexpression in verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien benutzt. Als primäres Genprodukt wurde zunächst die RNS isoliert, in Poly(A)$^-$-RNS und Poly(A)-RNS über Poly(U)-Sepharose- bzw. Oligo(dT)-Cellulose-Säulen fraktioniert und elektrophoretisch charakterisiert.
Das Molekulargewicht der Poly(A)$^-$-RNS, die hauptsächlich aus den ribosomalen RNS-Komponenten besteht, beträgt in 2,4 % Polyacrylamidgelen $1{,}3 \times 10^6$ Dalton (25S rRNS) und $0{,}7 \times 10^6$ Dalton (18S rRNS). Unter den denaturierenden Bedingungen der Elektrophorese in 4 % Formamid-Polyacrylamidgelen beträgt das Molekulargewicht $1{,}25 \times 10^6$ Dalton bzw. $0{,}64 \times 10^6$ Dalton.
Die Poly(A)-RNS aus Keimlingen von M.incana, die durchschnittlich 1-2 % der Gesamt-RNS darstellt, hat unter denaturierenden Bedingungen ein durchschnittliches Molekulargewicht von $3{,}9 \times 10^5$ Dalton. Dieser Wert entspricht einer mittleren Länge von 1.200 Nukleotiden.

Ein Vergleich der spezifischen Radioaktivität der Poly(A)-RNS aus Keimlingen, die unter Dauerlicht oder Dauerdunkel angezogen wurden, ergibt in Licht-Keimlingen eine um annähernd 40 % höhere Transkriptionsrate der Poly(A)-RNS als in Dunkel-Keimlingen.

Durch die Sättigungshybridisierung mit der Filtertechnik von Poly(A)-RNS und DNS wurde der Prozentsatz der DNS-Sequenzen sowie die Anzahl der Unique-Gene pro haploidem Genom bestimmt, die in den mRNS-Populationen aus verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien von M.incana (DNS-Gehalt 1,5 pg pro haploidem Genom) repräsentiert sind.
Mit der Poly(A)-RNS aus Licht-Keimlingen hybridisieren 0,22 % der DNS, entsprechend einer Anzahl von annähernd 6.000 Genen; 0,18 % Hybridisierung der DNS mit der Poly(A)-RNS aus Dunkel-

Keimlingen entsprechen annähernd 5.000 aktiven Genen; mit der Poly(A)-RNS aus Blüten von M.incana wird aus dem Hybridisierungswert von 0,26 % eine Anzahl von 6.800 transkribierten Genen berechnet. Bezogen auf den Anteil der Unique-DNS-Fraktion am M.incana-Genom von etwa 30 % entsprechen o,22 % Hybridisierung (Licht-Keimlinge) etwa 0,7 % einzelsträngiger Unique-DNS; 0,18 % Hybridisierung (Dunkel-Keimlinge) entsprechen 0,6 % einzelsträngiger Unique-DNS; 0,26 % Hybridisierung (Blüten) entsprechen etwa 0,85 % Einzelstrang-Unique-DNS.
Das Auftreten abundanter mRNS-Klassen in verschiedenen Entwicklungsstadien und in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad wird diskutiert.

Zum Nachweis einer höheren Komplexität der Poly(A)-RNS aus Zellkernen von M.incana-Keimlingen wurde ebenfalls eine Sättigungshybridisierung mit DNS durchgeführt. Die Hybridisierung von 1,08 % Gesamt-DNS entsprechend 3,56 % Einzelstrang-Unique-DNS zeigt, daß nur etwa 20 % der nuklearen Poly(A)-RNS in der cytoplasmatischen Poly(A)-RNS repräsentiert sind, d.h. daß die nukleare Poly(A)-RNS um etwa den Faktor 5 größer ist.

Hybridisierungsversuche der Poly(A)-RNS-Populationen aus Keimlingen und Blüten verschiedener M.incana-Stämme an Restriktionsfragmente der DNS führten zur Identifizierung spezifischer, für mRNS codierende DNS-Sequenzen. Das Eco RI-Fragment vom Molekulargewicht 0,92 x 10^6 Dalton enthält DNS-Sequenzen für mRNS-Klassen, die in M.incana vom Stamm 17 spezifisch im Differenzierungsstadium der Blütenbildung transkribiert werden. Eine Stamm-Spezifität der mRNS-Populationen zeigt sich in den Bst I-Fragmenten vom Molekulargewicht 2,6 x 10^6 Dalton und 0,68 x 10^6 Dalton, in denen codierende DNS-Sequenzen für spezifische mRNS-Klassen aus den Blüten vom Stamm 04 lokalisiert sind. Diese Bst I-Fragmente sind mit den mRNS-Populationen anderer M.incana-Stämme nicht hybridisierbar.

Die Spezifität der mRNS-Populationen aus Keimlingen vom Stamm 17 und aus den Blüten der Stämme 04, 06 und 17, sowie des Anteils nicht polyadenylierter mRNS der Poly(A)$^-$-RNS aus den Blüten der Stämme 04 und 06 auf dem Hintergrund genetisch bedingter Unterschiede in der Anthocyan-Biosynthese wurde in zellfreien Proteinsynthese-Systemen (Weizenkeim-System und Reticulocyten-Lysat) untersucht. Mit Ausnahme des Proteins vom Molekulargewicht 30.500 Dalton, das spezifisch nur von der nicht polyadenylierten mRNS-Fraktion der Poly(A)$^-$-RNS aus den Blüten der Stämme 04 und 06 translatiert wird, enthalten nicht polyadenylierte und polyadenylierte mRNS zum großen Teil informative Sequenzen für die gleichen Proteine.
Die Poly(A)-RNS-Populationen aus den Blüten der Stämme 04, 06 und 17 synthetisieren neben einer Vielzahl von Proteinen gleichermaßen ein Protein, dessen Molekulargewicht 29.000 Dalton beträgt. Dieses Protein wird jedoch bei der In-vitro-Translation der Poly(A)-RNS aus den Blüten vom Stamm 06 stark angereichert und zeigt, daß die spezifische codierende mRNS im Vergleich zu der entsprechenden mRNS in den Blüten der Stämme 04 und 17 in erhöhter Abundanz, d.h. in einer höheren Kopienzahl pro Zelle vorliegen muß. Basierend auf diesem Ergebnis und aufgrund von Unterschieden in der Translationsaktivität der untersuchten Poly(A)-RNS-Populationen im In-vitro-Translationssystem wird die Möglichkeit einer Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene diskutiert.

Mit der in den Blüten vom M.incana-Stamm 06 angereicherten mRNS für das 29.000-Dalton-Protein und aufgrund der Möglichkeit zur Identifizierung spezifischer mRNS-Sequenzen bzw. der komplementären Gen-Sequenzen durch die Hybridisierung mit Restriktionsfragmenten der DNS bietet sich ein aussichtsreicher Ansatzpunkt zur Isolierung und Anreicherung einer spezifischen mRNS für weitere Untersuchungen zur Genexpression und Genregulation bei M.incana.

6. LITERATURVERZEICHNIS

APEL, K. und KLOPPSTECH, K.: The plastid membranes of barley (Hordeum vulgare). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorphyll a/b protein.
Eur.J.Biochem. 85, 581-588 (1978)

APEL, K.: Phytochrome-induced appearance of mRNA activity for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein in barley (Hordeum vulgare).
Eur.J.Biochem. 97, 183-188 (1979)

AVIV, H. und LEDER, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo thymidylic acid - cellulose.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 1408-1412 (1972)

BANTLE, J.A. und HAHN, W.E.: Complexity and characterization of polyadenylated RNA in the mouse brain.
Cell 8, 139-150 (1976)

BANTLE, J.A., MAXWELL, I.H. und HAHN, W.E.: Specificity of oligo(dT)-cellulose chromatography in the isolation of polyadenylated RNA.
Anal.Biochem. 72, 413-427 (1976)

BISHOP, J.O. und ROSBASH, M.: Reiteration frequency of duck hemoglobin genes.
Nature New Biol. 241, 204-207 (1973)

BRAWERMAN, G.: Eukaryotic messenger RNA.
Ann.Rev.Biochem. 43, 621-642 (1974)

CAMPO, M.S. und BISHOP, J.O.: Two classes of messenger RNA in cultured rat cells: Repetitive sequence transcripts and unique sequence transcripts.
J.Mol.Biol. 90, 649-663 (1974)

CASHMORE, A.R.: Reiteration frequency of the gene coding for the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase.
Cell 17, 383-388 (1979)

CRIPPA, M., MEZA, I. und DINA, D.: Sequence arrangement in mRNA: Presence of poly(A) and identification of a repetitive fragment at the 5'-end.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 38, 933-942 (1973)

DANEHOLT, B.: Transcription in polytene chromosomes.
Cell 4, 1-9 (1975)

DARNELL, J.E., JELINEK, W.R. und MOLLOY, G.R.: Biogenesis of RNA: Genetic regulation in mammalian cells.
Science 181, 1215-1221 (1973)

DARNELL, J.E.: Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses.
Progr.Nucl.Acid Res.Mol.Biol. 22, 327-353 (1979)

DAVIDSON, E.H. und BRITTEN, R.J.: Organization, transcription and regulation in the animal genome.
Quart.Rev.Biol. 48, 565-613 (1973)

DAVIDSON, E.H., KLEIN, W.H. und BRITTEN, R.J.: Sequence organization in animal DNA and a speculation on hnRNA as a coordinate regulatory transcript.
Develop.Biol. 55, 69-84 (1977)

DAVIDSON, E.H. und BRITTEN, R.J.: Regulation of gene expression: Possible role of repetitive sequences.
Science 204, 1052-1059 (1979)

DERMAN, E. und DARNELL, J.E.: Relationship of chain transcription to poly(A) addition and processing of hnRNA in HeLa cells.
Cell 3, 255-264 (1974)

DINA, D.M., MEZA, I. und CRIPPA, M.: Relative position of the "repetitive","unique", and poly(A) fragments of mRNA. Nature 248, 486-490 (1974)

DIXON, M.: A nomogram for ammonium sulfate solutions. Biochem.J. 54, 457-458 (1953)

FIRTEL, R.A. und LODISH, H.F.: A small nuclear precursor of messenger RNA in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. J.Mol.Biol. 79, 295-314 (1973)

FLAVELL, R.B., BENNETT, M.D., SMITH, J.B. und SMITH, D.B.: Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. Biochem.Genet. 12, 257-269 (1974)

FRIEDRICH, H., HEMLEBEN, V. und KEY, J.L.: Restriction mapping of ribosomal RNA genes of higher plants. In: Genome and Chromatin: Organization, Evolution, Function (Hrsg.: Nagl., W., Hemleben, V., Ehrendorfer, F.); Plant Syst.Evol., Suppl. 2, 73-88 (1979)

GALAU, G.A., KLEIN, W.H., BRITTEN, R.J. und DAVIDSON, E.H.: Structural gene sets active in embryos and adult tissues of the sea urchin. Cell 7, 487-505 (1976)

GETZ, M.J., ALTENBURG, L.C. und SAUNDERS, G.F.: The use of RNA labelled in vitro with iodine-125 in molecular hybridization experiments. Biochim.Biophys.Acta 287, 485-494 (1972)

GETZ, M.J., BIRNIE, G.D., YOUNG, B.D., McPHAIL, E. und PAUL, J.: A kinetic estimation of base sequence complexity of nuclear poly(A)-containing RNA in mouse Friend cells. Cell 4, 121-129 (1975)

GILLESPIE, D. und SPIEGELMAN, S.: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J.Mol.Biol. 12, 829-842 (1965)

GLISIN, V. CRKVENJAKOV, R. und BYUS, C.: Ribonucleic acid isolated by caesiumchloride centrifugation. Biochem. 13, 2633-2637 (1974)

GOLDBERG, R.B., HOSCHEK, G. und KAMALAY, J.C.: Sequence complexity of nuclear and polysomal RNA in leaves of tobacco plants. Cell 14, 123-131 (1978)

GRAY, R.E. und CASHMORE, A.R.: RNA synthesis in plant leaf tissue: The characterization of messenger RNA species lacking and containing polyadenylic acid. J.Mol.Biol. 108, 595-608 (1976)

GRIERSON, D. und COVEY, S.: Changes in the amount of ribosomal and poly(A)-containing RNA during leaf development. Planta 127, 77-86 (1975)

GRIERSON, D. und COVEY, S.: The properties and function of rapidly-labelled nuclear RNA. Planta 130, 317-321 (1976)

GRIERSON, D. und HEMLEBEN, V.: Ribonucleic acid from the higher plant Matthiola incana. Molecular weight measurements and DNA/RNA-hybridization studies. Biochim.Biophys.Acta 475, 424-436 (1977)

HARRIS, S.E., MEANS, A.R., MITCHELL, W.M. und O'MALLEY, B.W.: Synthesis of (^{3}H)DNA complementary to ovalbumin messenger RNA: Evidence for limited copies of the ovalbumin gene in the chick oviduct. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 3776-3780 (1973)

HARRIS, S.E., ROSEN, J.M., MEANS, A.R. und O'MALLEY, B.W.: Use of a specific probe for ovalbumin messenger RNA to quantitate estrogen-induced gene transcripts. Biochem. 14, 2072-2081 (1975)

HEMLEBEN, V., ERMISCH, N., KIMMICH, D., LEBER, B. und PETER, G.: Studies on the fate of homologous DNA applied to seedlings of Matthiola incana. Eur.J.Biochem. 56, 403-411 (1975)

HEMLEBEN, V., GRIERSON, D. und DERTMANN, H.: The use of equilibrium centrifugation in actinomycin-caesium chloride for the purification of ribosomal DNA. Plant Science Lett. 9, 129-135 (1977)

HEREFORD, L.M. und ROSBASH, M.: Number and distribution of polyadenylated RNA sequences in yeast. Cell 10, 453-462 (1977)

HERMAN, R.C., WILLIAMSON, J.G. und PENMAN, S.: Message and non-message sequences adjacent to poly(A) in steady state heterogeneous nuclear RNA of HeLa cells. Cell 7, 429-437 (1976)

HOUGH, B.R., SMITH, M.J., BRITTEN, R.J. und DAVIDSON, E.H.: Sequence complexity of heterogeneous nuclear RNA in sea urchin embryos. Cell 5, 291-299 (1975)

HUNT, J.A.: Rate of synthesis and half-life of globin messenger ribonucleic acid. Biochem.J. 138, 499-510 (1974)

HUNT, J.A.: Ribonucleic acid synthesis in rabbit erythroid cells. Analysis of rates of synthesis of nuclear and cytoplasmic ribonucleic acid. Biochem.J. 160, 727-744 (1976)

INGLE, J., TIMMIS, J.N. und SINCLAIR, J.: The relationship between satellite deoxyribonucleic acid, ribosomal ribonucleic acid gene redundancy, and genome size in plants.
Plant Physiol. 55, 496-501 (1975)

KEDES, L.H. und BIRNSTIEL, M.L.: Reiteration and clusters of DNA sequences complementary to histone messenger RNA.
Nature New Biol. 230, 165-169 (1971)

KEITH, S., CHAPMAN, R. und INGLE, J.: The stability, polyadenylic acid content and ribonucleoprotein form of nuclear ribonucleic acid in Artichoke.
Biochem.J. 159, 585-600 (1976)

KEY, J.L. und SILFLOW, C.D.: The occurence and distribution of poly(A) ribonucleic acid in soybean.
Plant Physiol. 56, 364-369 (1975)

KIPER, M., HERZFELD, F.: DNA sequence organization in the genome of Petroselinum sativum (Umbelliferae).
Chromosoma 65, 335-351 (1978)

KIPER, M., BARTELS, D., HERZFELD, F. und RICHTER, G.: The expression of a plant genome in hnRNA and mRNA.
Nucl.Acids Res. 6, 1961-1978 (1979)

KLEIMAN, L., BIRNIE, G.D., YOUNG, B.D. und PAUL, J.: Comparison of the base-sequence complexities of polysomal and nuclear RNAs in growing Friend Erythroleukemia cells.
Biochem. 16, 1219-1223 (1977)

KRAMEROV, D.A., RYSKOV, A.P. und GEORGIEV, G.P.: The structural organization of nuclear pre-mRNA. II. Very long double-stranded structures in nuclear pre-mRNA.
Biochim.Biophys.Acta 475, 461-475 (1977)

LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685 (1970)

LEBER, B.: Entwicklung eines geeigneten pflanzlichen Donor-Rezipienten-Systems für den Nachweis der Aufnahme, Integration und Expression von exogener homologer DNS.
Dissertation, Tübingen (1977)

LEWIN, B.: Units of transcription and translation: The relationship between heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA.
Cell 4, 11-20 (1975)

LEVY, B.W., JOHNSON, C.B. und McCARTHY, B.J.: Diversity of sequences in total and polyadenylated nuclear RNA from Drosophila cells.
Nucl.Acids Res. 3, 1777-1789 (1976)

LIFTON, R.P., GOLDBERG, M.L., KARP, R.W. und HOGNESS, D.S.: The organization of the histone genes in Drosophila melanogaster: Functional and evolutionary implications.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 42, 1047-1051 (1977)

LIARAKOS, C.D., ROSEN, J.M. und O'MALLEY, B.W.: Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct. II. Transcription of chick tritiated unique deoxyribonucleic acid as measured by hybridization in ribonucleic acid excess.
Biochem. 12, 2809-2816 (1973)

LINDBERG, U. und PERSSON, T.: Isolation of mRNA from KB-cells by affinity chromatography on polyuridylic acid covalently linked to sepharose.
Eur.J.Biochem. 31, 246-254 (1972)

LODISH, H.F., FIRTEL, R.A. und JACOBSON, A.: Transcription and structure of the genome of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 38, 899-914 (1973)

LOENING, U.E.: Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution.
J.Mol.Biol. 38, 355-365 (1968)

LOENING, U.E.: The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis: The effects of changes in conformation.
Biochem.J. 113, 131-138 (1969)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265-275 (1951)

MONAHAN, J.H., HARRIS, S.E. und O'MALLEY, B.W.: Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct.
J.Biol.Chem. 251, 3738-3748 (1976)

MUTHUKRISHNAN, S., CHANDRA, G.R. und MAXWELL, E.S.: Hormone-induced increase in levels of functional mRNA and α-amylase mRNA in barley aleurones.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 6181-6185 (1979)

NAORA, H.: Some aspects of double-stranded hairpin structures in heterogeneous nuclear RNA.
Intern.Rev.Cytol. 56, 255-313 (1979)

OHTA, T. und KIMURA, M.: Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution.
Nature 233, 118-119 (1971)

OROSZ, J.M. und WETMUR, J.G.: In vitro iodination of DNA. Maximizing iodination while minimizing degradation; use of bouyant density shifts for DNA-DNA hybrid isolation.
Biochem. 13, 5467-5473 (1974)

PELHAM, H.R.B. und JACKSON, R.J.: An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.
Eur.J.Biochem. 67, 247-256 (1976)

PHARMACIA: Broschüre zu: Affinity Chromatography. Principles and methods.
Pharmacia Fine Chemicals (Hrsg.), Uppsala, Schweden (1974)

REESE, H. und JONES, R.N.: The origin of the wide species variation in nuclear DNA content.
Intern.Rev.Cytol. 32, 53-92 (1972)

ROBERTS, B.E. und PATERSON, B.M.: Efficient translation of tabac mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 2330-2334 (1973)

ROZEK, C.E., ORR, W.C. und TIMBERLAKE, W.E.: Diversity and abundance of polyadenylated RNA from Achlya ambisexualis.
Biochem. 17, 716-722 (1978)

RYFFEL, G.U.: Comparison of cytoplasmic and nuclear poly(A)-containing RNA sequences in Xenopus liver cells.
Eur.J.Biochem. 62, 417-423 (1976)

RYSKOV, A.P., KRAMEROV, D.A. und GEORGIEV, G.P.: The structural organization of nuclear messenger RNA precursor. I. Reassociation and hybridization properties of double-stranded hairpin-like loops in messenger RNA precursor.
Biochim.Biophys.Acta 447, 214-229 (1976)

SCHAFFNER, W., GROSS, K., TELFORD, J. und BIRNSTIEL, M.: Molecular analysis of the histone gene cluster of Psamechinus miliaris: II. The arrangement of the five histone-coding and spacer sequences.
Cell 8, 471-478 (1976)

SEYFFERT, W.: Über Geninteraktionen bei der Ausbildung von Blütenfarbstoffen.
XIV. Intern.Hort.Congr.IV, 19-28 (1962)

SEYFFERT, W.: Stimulation of quantitative characters by genes with biochemically definiable action. II. The material.
Theor.Appl.Genet. 41, 285-291 (1971)

SILFLOW, C.D., HAMMETT, J.R. und KEY, J.L.: Sequence complexity of polyadenylated ribonucleic acid from soybean suspension culture cells.
Biochem. 18, 2725-2731 (1979)

SOUTHERN, E.M.: Detection of specific sequences amoung DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J.Mol.Biol. 98, 503-517 (1975)

SPOHR, G., MIRAULT, M.-E., IMAIZUMI, T. und SCHERRER, K.: Molecular weight determination of animal-cell RNA by electrophoresis in formamide under fully denaturing conditions on exponential polyacrylamide gels.
Eur.J.Biochem. 62, 313-322 (1976)

SPRADLING, A., PENMAN, S., CAMPO, M.S. und BISHOP, J.O.: Repetitious and unique sequences in the heterogeneous nuclear and cytoplasmic messenger RNA of mammalian an insect cells.
Cell 3, 23-30 (1974)

SPRIBILLE, R.: Der Einfluß der Gene a und h auf die Flavonoidbiosynthese in Matthiola incana.
Diplomarbeit, Tübingen (1979)

SULLIVAN, D., PALACIOS, R., STAVNEZER, J., TAYLOR, J., FARAS, A.J., KIELY, M.L., SUMMERS, N.M., BISHOP, J.O. und SCHIMKE, R.T.: Synthesis of a deoxyribonucleic acid sequence complementary to ovalbumin messenger ribonucleic acid and quantification of ovalbumin genes.
J.Biol.Chem. 248, 7530-7539 (1973)

TIMBERLAKE, W.E., SHUMARD, D.S. und GOLDBERG, R.B.: Relationship between nuclear and polysomal RNA populations of Achlya: A simple eukaryotic system.
Cell 10, 623-632 (1977)

TOBIN, E.M.: Light-regulation of specific mRNA species in Lemna gibba L. G-3.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 4749-4753 (1978)

TONEGAWA, S.: Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: Further evidence for somatic generation of antibody diversity.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 203-207 (1976)

WALBOT, V. und DURE, L.S.: Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. VII. Characterization of the cotton genome.
J.Mol.Biol. 101, 503-536 (1976)

WEINBERG, E.S., BIRNSTIEL, M.L. PURDOM, I.F. and WILLIAMSON, R.: Genes coding for polysomal 9S RNA of sea urchin: Conservation and divergence.
Nature 240, 225-228 (1972)

WENZEL, W.: Charakterisierung des Genoms einer höheren Pflanze (Matthiola incana, Cruciferae).
Diplomarbeit, Tübingen (1977)

WENZEL, W. und HEMLEBEN, V.: DNA reassociation studies and considerations on the genome organization and evolution of higher plants. In: Genome and Chromatin: Organization, Evolution, Function (Hrsg.: Nagl, W., Hemleben, V., Ehrendorfer, F.), Plant Syst.Evol., Suppl. 2, 29-49 (1979)

WENZEL, W.: Renaturierungskinetische Studien zur Organisation und genetischen Aktivität des Genoms einer höheren Pflanze (Matthiola incana, Brassicaceae).
Dissertation, Tübingen (1980)

WIENAND, G. und FEIX, G.: Electrophoretic fractionation and translation in vitro of poly(rA)-containing RNA from maize endosperm.
Eur.J.Biochem. 92, 605-611 (1978)

ZIMMERMANN, J.L. und GOLDBERG, R.B.: DNA sequence organization in the genome of Nicotiana tabacum.
Chromosoma 59, 227-252 (1977)

Lebenslauf

Name, Vorname:	Gollmer, Ingrid Barbara
Geboren:	18.5.1950 in Dettingen
Eltern:	Gollmer, Reinhold, Kalkulator, und
	Gollmer, Berta, geb. Handel

Schulausbildung

1957 bis 1960	Volksschule Dettingen
1961 bis 1969	Gymnasium Metzingen
	Abitur am 14.6.1969

Studium

1970 bis 1976	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
1975	Diplom-Prüfung in Biologie
1975 bis 1976	Diplomarbeit am Institut für Biologie I, Lehrstuhl für Botanik, unter Anleitung von Prof. U. Seitz
1976 bis 1980	Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik, unter Anleitung von Prof. Vera Hemleben.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bentrup - Grell - Guglielmi - Hemleben - Hennig - Krüger - Mägdefrau - Metzner - Möhres - E. Müller - Pracht - Rüdorff - Sander - Schweizer - Schwemmle - Seiler - Seyffert - Weitzel - Weser - Wöhrmann - Zähner - Zetsche.